

Die Entwicklung der Keimbahn
während der Embryogenese von *Caenorhabditis elegans*

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Sophie von Elsner

aus Thuine

| | |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| 1. Referent: | Professor Dr. Ralf Schnabel |
| 2. Referent: | Professor Dr. Norbert F. Käufer |
| eingereicht am: | 11.06.2007 |
| mündliche Prüfung (Disputation) am: | 01.08.2007 |
| Druckjahr | 2008 |

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

von Elsner, S., Schmidt, H., Wilm, T., Feichtinger, F., Schnabel, H. and Schnabel, R.: The *cib* Genes (Poster) European Worm Meeting, Interlaken, Schweiz (2004)

von Elsner, S., Schmidt, H., Feichtinger, F. and Schnabel, R.: Germ line development in early *C. elegans* embryos (Poster) Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie, Münster (2005)

von Elsner, S., Schmidt, H. und Schnabel, R.: Development of germ line precursor cells (Poster) International *C. elegans* Meeting, Los Angeles, CA, USA (2005)

von Elsner, S., Schmidt, H. and Schnabel, R.: Maintenance of asymmetry during germ line cell cleavages (Poster) European Worm Meeting, Kreta, Griechenland (2006)

von Elsner, S., Schmidt, H. and Schnabel, R.: Maintenance of germ line in *C. elegans* embryos (Poster) International Conference: Embryonic and Somatic Stem Cells – Regenerative Systems for Cell and Tissue Repair, Dresden (2006)

Braunschweig, 08.05.2007

Danksagung

Bei meinem Mentor Prof. Dr. Ralf Schnabel bedanke ich mich für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die Betreuung und Unterstützung während meiner Arbeit. Herrn Prof. Dr. Norbert F. Käufer danke ich für die Übernahme des Correferats und für seine Diskussionsbereitschaft zu jeder Zeit.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hans-Henning Arnold und Herrn Prof. Dr. Martin Korte für ihre Bereitschaft, die Prüfungskommission zu bilden.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Henning Schmidt für die intensiven Diskussionen, für seine Hilfsbereitschaft und für die gemeinsame Arbeit am *cib*-Projekt. Für die gute Zusammenarbeit während des *cib*-Projektes bedanke ich mich auch bei Jasmin Fetisch. Bei Dr. Juan Cabello, Dr. Anja-Kristina Schulz, Dr. Ingo Büssing und Dr. Marcus Bischoff bedanke ich mich für die langen und spannenden, (nicht nur) wissenschaftlichen Diskussionen und für die gute Zusammenarbeit.

Bei allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und des Sekretariats bedanke ich mich für das sehr nette Arbeitsklima und für die Hilfe bei den großen und kleinen Aufgaben des Laboralltags: Bei den TAs Cathrin Struck, Annette Otto und Christiane Lindemann, bei den Sekretärinnen Tanja Brendeke, Ulrike Nissen, Marion Utecht und Ute Kyrath, den Spülfrauen Helga Heimann und Petra Pollum, bei Dr. Andreas Hejzol und Dr. Matthias Müller, bei Ufuk Günesdogan, Felicia Heidebrecht und Nadin Memar.

Bei Pierre Gönczy bedanke ich mich für das Interesse an meiner Arbeit und die interessanten Diskussionen. Außerdem danke ich Pierre Gönczy, Geraldine Seydoux, Kenneth Kemphues und Theresa Stiernagel für die Überlassung von *C. elegans*- und Bakterienstämmen.

Ich möchte mich auch bei meinen Freunden und fleißigen Helfern bedanken, die mich sehr unterstützt haben und meine Arbeit korrigiert haben: Manuela Lotz, Gunnar Bock, Hella Tappe, Birka von Schmidt, Mirja und Malte Rothhämel und Wulf Rothhämel.

Meinen Eltern danke ich für ihre vielseitige Unterstützung, und die Ermöglichung des Studiums. Besonders meinem Freund Jörg Rothhämel danke ich für seine Unterstützung und Hilfe während der ganzen Zeit meiner Doktorarbeit.

Zusammenfassung

Viele Fragen über die Entwicklung der embryonalen Keimbahn sind noch offen. In embryonal letalen Mutanten von *C. elegans* in den Genen *cib-1*, *cib-2* und *cib-3* (*cib* steht für *changed identity of blastomeres*) sind typische Merkmale der Keimbahnentwicklung betroffen. Die P-Zellen als Keimbahnzellen teilen sich nicht asymmetrisch, sondern symmetrisch. Jede Asymmetrie scheint in *C. elegans* von der ursprünglichen Polarität der Zygote abzuhängen, die nach dem Eintritt des paternalen Pronucleus mit der Verteilung der PAR-Proteine an den Zellcortex festgelegt wird. Die asymmetrische Verteilung dieser Proteine am Zellcortex verursacht in der Zygote eine Reorganisierung des Cytoplasmas. Nicht nur die P-Granulae (nuage), sondern auch keimbahnspezifische Proteine, wie z.B. der Transkriptionsfaktor PIE-1, werden in das posteriore Cytoplasma segregiert und gelangen von da in die P-Zellen. In den *cib*-Mutanten geht die Keimbahnidentität in einer der drei Zellen P1, P2 oder P3 verloren. Diese Blastomeren verzögern die Zellteilung bis zu einer ganzen Zellzyklus-Länge und teilen sich dann symmetrisch statt asymmetrisch.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mutanten in allen drei Genen analysiert und das Gen *cib-3* kloniert. *cib-1* hat eine sehr spezifische Funktion bei der Entwicklung der Keimbahn, obwohl das Gen überraschend für die einzige Thymidylat Synthase in *C. elegans* codiert. Nach einer Inaktivierung der Zellzyklus-Kontrolle mit *atl-1 chk-1*-RNAi teilen sich in *cib-1*-Embryonen die P-Zellen nicht mehr verzögert, aber immer noch symmetrisch. Die Verbindung der dTTP-Synthese mit der Zellzyklus-Kontrolle definiert einen neuen Prozess, der die Entwicklung der Keimbahn über eine Qualitätskontrolle für die DNA-Integrität steuert. Nach der Klonierung gibt die nematodenspezifische Sequenz von *cib-3* keinen Hinweis auf eine Funktion. In dieser Arbeit wurden in einer Yeast-two-Hybrid-Suche als Interaktionspartner von CIB-3 die Proteine RACK-1 (*rezeptor activated C-type kinase*) und eine Cathepsin L Cystein Proteinase (F57F5.1) identifiziert. Für keines der beiden stark konservierten Proteine wurde bisher eine Funktion in der Embryonal- oder Keimbahnentwicklung beschrieben. RNAi-Experimente mit beiden Genen zeigen einen typischen *cib-3*-Phänotyp, was eine Funktion der Gene im gleichen Prozess nahe legt. CIB-3 beeinflusst die Segregation

Zusammenfassung

von Proteinen wie PIE-1, das normalerweise in die P-Zellen segregiert wird, und MEX-5, das normalerweise in die somatischen Zellen segregiert wird. In *cib-3*-Embryonen werden beide Proteine nicht aufgeteilt und gelangen bei der nächsten Zellteilung in die gleichen Tochterzellen. Als Folge exprimieren diese Tochterzellen gleichzeitig somatische und keimbahnspezifische Proteine. Das Protein CIB-3 ist ebenfalls für die asymmetrische Positionierung der Spindel notwendig. Nach symmetrischen P-Zell-Teilungen versagt in *cib-3*-Embryonen auch die Lokalisierung der PAR-Proteine. Diese neuen Beobachtungen machen es wahrscheinlich, dass CIB-3 für die Transmission der corticalen Polarität in eine cytoplasmatische Polarität benötigt wird. Das Fehlen dieser Polarität verhindert die Verteilung keimbahnspezifischer Faktoren in der P-Zelllinie. *cib-2* ist ein bis zum Menschen sehr konserviertes Gen, für das bisher keine Funktion bekannt ist. Wie in *cib-1*-Embryonen zeigt der *atl-1 chk-1*-RNAi auch in *cib-2(e2294)* die Abhängigkeit des Phänotyps von der Zellzyklus-Kontrolle. CIB-2 interagiert wie CIB-3 in einem Yeast-two-Hybrid mit RACK-1 und der Cathepsin L Proteinase, so dass *cib-2* eine Verbindung zu der Etablierung der cytoplasmatischen Zellpolarität für die Keimbahnentwicklung hat.

Obwohl die Mutanten in den drei *cib*-Genen sehr ähnliche Phänotypen haben, sind die Gene an zwei verschiedenen, neu beschriebenen Prozessen beteiligt. Der eine Prozess steuert die Transmission der Zellpolarität in eine cytoplasmatische Polarität für die Segregation keimbahnspezifischer Proteine. Der andere Prozess reguliert die Keimbahnentwicklung mit einer Qualitätskontrolle für die DNA-Integrität. An beiden essentiellen Prozessen sind sehr konservierte Proteine beteiligt, so dass sie möglicherweise auch in anderen Organismen die Entwicklung einer gesunden Keimbahn steuern.

1 Einleitung

Berichte zu den Themen Stammzellen und Klonen erscheinen beinahe täglich in den Medien. Populärwissenschaftliche Beiträge versprechen mittels Stammzelltherapie medizinische Wunder, von der Heilung verschiedener Krankheiten bis zur Vermeidung erblicher Behinderungen (Badenschier, 09. Mai 2007). Mit Hilfe des Klonens scheint für manche sogar das Design idealer Erbanlagen für Wunschkinder absehbar. Die Forschung an humanen embryonalen Stammzellen und das therapeutische Klonen werden in Deutschland allerdings sehr kontrovers diskutiert (<http://www.ethikrat.org>). In führenden wissenschaftlichen Journalen dagegen werden die Entwicklungsmöglichkeiten der Stammzellen wesentlich distanzierter dargestellt (Hochedlinger und Jaenisch, 2006). Das relativ junge Forschungsgebiet eröffnet eine Vielzahl neuer Fragestellungen, da die Eigenschaften und Aufgaben der Stammzellen im komplexen Organismus weitgehend unbekannt sind. In dieser Arbeit werden besonders differenzierungsfähige Stammzellen, die embryonalen Keimbahnzellen, näher untersucht. Neue Prozesse, durch die sich die Keimbahnzellen als Stammzellen von anderen Zellen unterscheiden, werden nach der Charakterisierung und Klonierung von Mutanten in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) identifiziert.

Stammzellen kommen in allen mehrzelligen Eukaryonten (Metazoa) vor. Es ist generell üblich, alle Zellen als Stammzellen zu definieren, deren Entwicklungspotenzial nicht auf ein differenziertes Gewebe eingeschränkt ist. Stammzellen können sich einerseits asymmetrisch in zwei Zellen mit verschiedenem Entwicklungspotenzial teilen, z.B. in eine sich differenzierende Zelle und eine weitere Stammzelle. Die Tochterzellen können dabei dieselben Teilungsmöglichkeiten erhalten wie die Ausgangszelle (Autoreproduktion kommt beispielsweise in schnell proliferierenden Geweben wie dem Darmepithel vor, Ishizuka *et al.*, 2003). Andererseits sind symmetrische Teilungen in zwei Zellen mit dem gleichen Potenzial möglich. Stammzellen können über eine längere Zeitspanne ruhen und behalten dennoch ihre besondere Teilungsfähigkeit. Das Entwicklungspotenzial der Stammzellen ist mit der Zellzyklus-Regulation eng verknüpft und bildet eine Voraussetzung für Regeneration (z.B. bei Verletzungen des Epithels in Vertebraten). Die meisten Stammzelltypen wie z.B. hämatopoietische

Stammzellen (Schmittwolf *et al.*, 2005) können sich nur zu bestimmten somatischen Zellarten entwickeln, sie sind pluripotent. Eine Sonderstellung unter den Stammzellen nehmen dagegen die totipotenten Zellen ein, die jede beliebige Zelle bilden können. Zu dieser Gruppe gehören vor allem die embryonalen Stammzellen und evtl. einige wenige andere wie die adulten spermatogonialen Stammzellen in Mensch und Maus (Guan *et al.*, 2006). Totipotente Zellen gehören zu und entstehen aus den Keimbahnzellen. Zur Keimbahn gehören alle Zellen eines Organismus, die durch Teilung direkt zur Bildung der Gameten beitragen. Was unterscheidet also die Keimbahnzellen von somatischen Stammzellen?

Jede Mutation in den Keimbahnzellen wird an die Gameten weitergegeben und kann potenziell an die Filialgeneration vererbt werden. Der Schutz der Keimbahn und ihrer Funktion ist also für die erfolgreiche Fortpflanzung eines Organismus essentiell. Aber was ist die Voraussetzung für die Bildung einer Keimbahn? Trotz der vielen aktuellen Bemühungen ist bisher weitgehend unbekannt, welche molekularen Prozesse die Etablierung der Keimbahn im Embryo steuern. Die entstehende Asymmetrie zwischen *Keimbahn* und *Soma* ist oft eine der ersten in der Embryogenese. Keimbahnzellen entwickeln sich bei gleicher genetischer Information anders als ihre Schwester- oder Tochterzellen. In den Zellteilungen wird das Entwicklungspotenzial asymmetrisch auf zwei Zellen verteilt. Welchen Prozess die Zellen für die Etablierung der Asymmetrie nutzen, ist nicht geklärt. Ein weiterer Prozess muss das spezifische Entwicklungspotenzial von Zelle zu Zelle weitergeben, um die Keimbahn zu erhalten. Jede Veränderung in diesen Prozessen kann die Identität der Keimbahnzellen stören und so z.B. zu ektopischen Zellteilungen führen. Am Bekanntesten ist hier die Entstehung von Teratomen. Ein Teratom ist ein abgekapselter, meist gutartiger Tumor aus Keimbahnzellen, der aus verschiedenen undifferenzierten und differenzierten Geweben wie Haut, Haaren, Knochen und Zähnen besteht. Auch unter medizinischen Aspekten ist daher eine intensive Grundlagenforschung an der Keimbahnentwicklung sinnvoll.

Die Keimbahnzellen proliferieren grundsätzlich während zweier verschiedener Phasen. Während der Embryogenese entsteht eine minimale Anzahl von Keimbahnzellen aus der totipotenten Zygote. Bei den meisten Metazoa ist die Zahl der Zellteilungen in der embryonalen Keimbahn sehr gering und bietet wahrscheinlich einen Schutz vor

Mutationen innerhalb einer Generation von Organismen. Die Keimbahnzellen ruhen während der weiteren Entwicklung und proliferieren erst in der zweiten Phase wieder, um im adulten Organismus die Gameten zu bilden. Die Bildung der Gameten in der zweiten Proliferationsphase ist sowohl nach Art als auch nach Geschlecht eines Organismus sehr verschieden. Ein Beispiel für die organismenspezifische Differenzierung von Gameten sind die Säugetiere (Mammalia), bei denen sich Spermien oder Oozyten je nach Geschlecht des Organismus entwickeln. In manchen Invertebraten wie z.B. in dem Nematoden *C. elegans* entwickeln sich Spermien und Oozyten zeitlich nacheinander im gleichen Organismus (Greenstein, 2005).

Sowohl die Etablierung als auch der Erhalt der Keimbahn lassen sich in der ersten Proliferationsphase, der embryonalen Gametogenese, gut beobachten. Das besondere Interesse der Entwicklungsbiologie an dieser Phase erklärt sich aus den oben genannten Eigenschaften der Keimbahnzellen. Die Suche nach der genetischen Grundlage für die erste Proliferationsphase der Keimbahn kann einen Teil der zeitlichen und räumlichen Musterbildung im Embryo aufdecken. Bei *C. elegans* wird die Keimbahn in nur fünf embryonalen Zellteilungen angelegt (siehe Kapitel 1.2, S. 7). Viele konservierte Signalwege, die an sehr unterschiedlichen Prozessen in verschiedenen Organismen beteiligt sind, wurden in den verhältnismäßig einfachen Nematoden entdeckt (Eisenmann, 2005; Wu *et al.*, 2000). Durch seine geringe Komplexität und die experimentellen Möglichkeiten bietet sich *C. elegans* als Modellorganismus bei der Suche nach generellen Mechanismen für die Etablierung und den Erhalt der Keimbahn an.

1.1 *C. elegans* als Modellorganismus in der Entwicklungsbiologie

Sydney Brenner hat *C. elegans* als Modellorganismus in die Entwicklungsbiologie eingeführt (Brenner, 1974). Der Nematode hat bei 25°C eine kurze Generationszeit von drei Tagen und lässt sich unter einfachen Laborbedingungen problemlos kultivieren. Ausgewachsene Tiere sind ca. 1 mm groß. Fast alle Individuen sind Hermaphroditen, es entstehen aber durch Chromosomenfehlverteilung in der Meiose auch etwa 0,1 % Männchen. Das Genom wurde als erstes unter den Genomen der Metazoa weitgehend sequenziert und codiert ca. 20.000 Gene (Hodgkin, 2005; Hodgkin und Herman, 1998). *C. elegans* bietet als Modellsystem sehr gute klassisch-genetische Methoden, die durch viele molekular- und zellbiologische Techniken ergänzt werden. Erst kürzlich wurde der

Nobelpreis für Physiologie bzw. Medizin 2006 für die Entdeckung von RNAi (*RNA interference*, siehe Kapitel 4.4, S. 126) in *C. elegans* an Andrew Fire und Craig Mello verliehen. Mit verschiedenen Methoden wurden bereits verschiedene Signalwege wie z.B. der Wnt-Signalweg für spezifische Prozesse beschrieben (Eisenmann, 2005; Rocheleau *et al.*, 1997; Shackleford *et al.*, 1993; Thorpe *et al.*, 1997).

John Sulston beobachtete die durchsichtigen Embryonen mit einem Mikroskop und beschrieb die stereotype Zelllinie als Beispiel für eine invariante Entwicklung (Sulston *et al.*, 1983). Mit der 4D-Mikroskopie (Schnabel *et al.*, 1997) kann jeder Embryo über einen längeren Zeitraum und in 25 Ebenen aufgenommen werden. Die Zellgenealogie jeder einzelnen Zelle bis zur terminalen Differenzierung wird in diesen Aufnahmen mit der Software SIMI°Biocell verfolgt (Schnabel *et al.*, 1997). Aus der Zygote entwickeln sich bis zum Schlüpfen der Larve 558 Zellkerne, weitere 115 Zellen sterben während der Embryonalentwicklung. Für die Beschreibung der Apoptose in *C. elegans* wurde 2002 der Nobelpreis an Sydney Brenner, John Sulston und Bob Horvitz verliehen. Die beteiligten Gene und ihre Funktion konnten nach der Analyse von Mutanten identifiziert werden (Ellis und Horvitz, 1986). Die Suche nach letalen Mutanten in *C. elegans* führte genau wie in *Drosophila melanogaster* (*Drosophila*) zu der Beschreibung vieler essentieller Gene (Kemphues *et al.*, 1988; Kemphues *et al.*, 1986; Nusslein-Volhard *et al.*, 1980; Priess und Thomson, 1987), die in zwei Klassen eingeteilt werden. Zygotische Gene werden im Organismus selbst transkribiert und sorgen z.B. für Zellproliferation, Differenzierung und Morphogenese (Mango *et al.*, 1994; Schnabel, 1990). Dagegen wird die frühe Embryogenese von maternalen Genen gesteuert, deren Transkripte vom Hermaphroditen bereitgestellt werden (Bowerman *et al.*, 1992; Kemphues *et al.*, 1988). Sie legen unter anderem die Körperachsen und die Zellteilungsrichtungen im Embryo fest und spezifizieren die Blastomeren (Hutter und Schnabel, 1995b; Thorpe *et al.*, 1997). Die frühen Differenzierungsmuster der Embryonen können auch als Modell für die Embryonalentwicklung von Vertebraten dienen.

Außer der Zelllinie und den konservierten Signalwegen und Entwicklungsprozessen sind die temperatursensitiven (ts) Mutanten ein weiterer Vorteil des Systems *C. elegans* gegenüber anderen Modellorganismen für die Keimbahnentwicklung. Maternal letale ts-

Mutanten können eine Untersuchung von essentiellen Genen vereinfachen und Einblicke in die molekularen Regulationsmechanismen der Keimbahnentwicklung ermöglichen. Bevor der Phänotyp einer solchen Mutante postuliert und beschrieben wird (Kapitel 1.3), werden zunächst die Anlage der Keimbahn und die frühe Zelllinie von *C. elegans* vorgestellt (Kapitel 1.2).

1.2 Die Embryonalentwicklung von *C. elegans*

Einer der ersten Prozesse, die in der gerade befruchteten Zygote beginnen, ist die Etablierung der antero-posterioren Achse (a-p-Achse, Goldstein und Hird, 1996). Der Prozess beginnt, sobald ein Centriol gemeinsam mit dem männlichen Pronukleus in die Oozyte übertragen wird. Ob die Polarisierung erst durch die Befruchtung ausgelöst wird oder ob der Eintrittspunkt des Spermiums vorgegeben ist, konnte bisher nicht geklärt werden. Das Centriol lagert sich am nächstgelegenen Punkt des Zellcortexes an und markiert den posterioren Pol der Zelle (Abbildung 1.1a, P0 links). Von diesem Punkt breitet sich die Polarisierung zuerst entlang des Cortexes und später über das gesamte Cytoplasma aus. Sobald die Etablierung der a-p-Achse abgeschlossen ist, verschmelzen die beiden Pronuklei im Mittelpunkt der Zelle und die erste Zellteilung beginnt (Abbildung 1.1a, P0 rechts). Dieser Prozess wurde in *C. elegans* und auch in *Drosophila* auf molekularer Ebene bereits grundlegend untersucht. Bei der Etablierung der a-p-Achse spielen die PAR-Proteine eine zentrale Rolle, die später noch detailliert beschrieben wird (siehe Ergebnisse 2.17, S. 81, Kemphues *et al.*, 1988; Rose und Kemphues, 1998).

Mit der Bildung der a-p-Achse werden die Teilungsrichtung, das Zellteilungsmuster und das Schicksal der Tochterzellen festgelegt. Die beiden anderen Körperachsen werden erst später im Embryo angelegt (Hutter und Schnabel, 1994; Shelton und Bowerman, 1996). Die erste stammzellartige Teilung der Zygote bildet die Grundlage für die Differenzierung von Zellen und für die Etablierung der Keimbahn. Die pluripotente Zygote P0 teilt sich asymmetrisch entlang der a-p-Achse. Anterior bildet die Blastomere AB ausschließlich somatische Zellen, posterior liegt die kleinere P1-Zelle, aus der in der späteren Entwicklung die Keimbahn hervorgeht. In Abbildung 1.1 ist die frühe Zelllinie von *C. elegans* zusammengefasst dargestellt.

Aus der P-Zelllinie (P1 bis P4) gehen in drei stammzellartigen, asymmetrischen Zellteilungen die somatischen Blastomeren EMS, C und D hervor. Die EMS-Blastomere teilt sich ebenfalls asymmetrisch in die Blastomeren MS und E. Fast alle somatischen Blastomeren (vgl. Abbildung 1.1b, z.B. AB-Zelllinie) teilen sich symmetrisch und tragen jeweils zu der Entwicklung von verschiedenen Geweben des Wurms bei. Nur zwei (E- und D-Zelllinie) bilden klonal je ein Gewebe. Die letzte Zellteilung in der P-Zelllinie (Abbildung 1.1b, P4) ist symmetrisch. Beide Tochterzellen Z2 und Z3 ruhen bis zur Larvalentwicklung und teilen sich erst in den Gonaden weiter. Hier muss es eine direkte Kopplung des Zellschicksals mit seinem Stammzellcharakter an die Regulation des Zellzyklus geben (Schnabel und Schnabel, 1990).

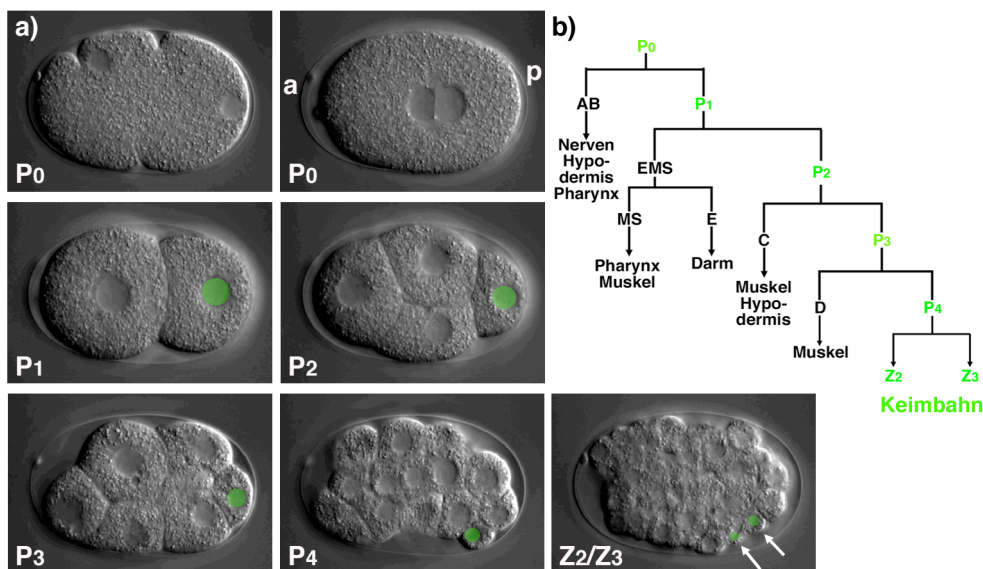


Abbildung 1.1: Die frühe Zelllinie von *C. elegans*. (a) Die Zellen in einem Embryo sind bei Nomarski-Optik gut zu erkennen. Die somatische Tochterzelle ist bei jeder Teilung größer als die P-Zelle und liegt fast immer anterior. P0 links) Einzelliger Embryo vor der Polarisierung. P0 rechts) Abgeschlossene Polarisierung der Zygote bei Treffen der Pronuklei. Anterior (a) und posterior (p) sind markiert. P1) 2-Zeller, der Zellkern der P1-Zelle ist grün markiert. P2) 4-Zeller. P3) 12-Zeller. P4) Der Embryo hat etwa 40 Zellen, wenn P4 gebildet wird. Z2/Z3) Die beiden Zellen ruhen bis zur Larvalentwicklung. Anterior ist in allen Bildern links, dargestellt ist die mittlere Fokusebene in einem WT-Embryo. b) In nur vier asymmetrischen Teilungen werden die embryonalen Zellen P1 bis P4 gebildet, aus denen sich die Keimbahn entwickelt (grün markiert).

Ursprünglich wurde angenommen, dass sich die beiden Zelllinien AB und P auf grundsätzlich verschiedene Weise entwickeln (Priess und Thomson, 1987). So entwickelt sich eine isolierte P1-Zelle autonom zu denselben Zellen wie in einem normalen Wildtyp-Embryo (WT-Embryo), aus der pluripotenten P-Zelllinie wird die Keimbahn gebildet (Abbildung 1.1b). Mittlerweile sind mehrere Gene wie *skn-1* (siehe

Kapitel 4.6, S. 141) bekannt, die als Transkriptionsfaktoren die Entwicklung der Zellen steuern (Bowerman *et al.*, 1992). Die Entwicklung der AB-Zelllinie ist dagegen konditional abhängig von verschiedenen Induktionen (Hutter und Schnabel, 1994; Hutter und Schnabel, 1995a; Hutter und Schnabel, 1995b; Schnabel, 1995), die über stark konservierte Signalwege von anderen Zellen ausgehen. Im folgenden Absatz werden drei der Induktionen beschrieben, die von den P-Zellen ausgehen. Die anderen Induktionen (mindestens sieben, Schnabel, 1995) erfolgen teils später in der Embryonalentwicklung und sind für das Verständnis der Arbeit nicht essentiell.

Die erste Induktion ist die a-p Polarisierung der AB-Zelle durch P1 (Hutter und Schnabel, 1995b). Im 4-Zell-Stadium wird in der EMS-Zelle das E-Schicksal durch P2 über den Wnt-Signalweg induziert (Thorpe *et al.*, 1997). Kurz danach folgt die dritte Induktion in ABp, sie geht ebenfalls von P2 aus (Hutter und Schnabel, 1994). Wenn die Entwicklung der P-Zellen durch Mutationen geschädigt wird, können die Induktionen in den somatischen Zelllinien nicht oder nur teilweise erfolgen. Die Entwicklung der somatischen Zellen kann so sekundär beeinträchtigt werden.

Spezifisch für die Keimbahn in *C. elegans* sind die P-Granulae, die immer in die P-Zelllinie segregiert werden. Sie galten zuerst als morphogenetische Determinanten für die autonome P-Zell-Spezifizierung (Strome und Wood, 1983). Neuere Ergebnisse zeigen jedoch, dass sie Ribonucleoprotein-Komplexe sind und Regulatoren der Translation enthalten (Kawasaki *et al.*, 2004; Spike und Strome, 2003). Eine Funktion der P-Granulae in Bezug auf den Erhalt der Keimbahn wurde bisher nicht gezeigt. Nach einem Verlust der Keimbahn in verschiedenen Mutanten werden die P-Granulae abgebaut (Hird *et al.*, 1996), daher eignen sie sich als Marker für den Keimbahncharakter einer Zelle.

Die embryonale Keimbahn wird bereits in der Zygote angelegt und der Stammzellcharakter in der P-Zelllinie bis in Z2 und Z3 erhalten. Über die Gene, die am Erhalt der Keimbahn beteiligt sind, ist bisher nichts bekannt. Die Untersuchung verschiedener Mutanten in dieser Arbeit soll Hinweise auf relevante Prozesse liefern.

1.3 Die Keimbahn wird in den *cib*-Mutanten nicht entwickelt

Die Charakterisierung von maternal letalen Mutanten kann molekulare Mechanismen aufdecken, die die embryonale Keimbahn erhalten (siehe Kapitel 1.1 und 1.2). Die beschriebenen Eigenschaften der Keimbahnzellen geben einen ganz bestimmten Phänotyp für die gesuchten Mutanten vor:

- In den Mutanten dürfen sich die P-Zellen nicht asymmetrisch teilen.
- Keimbahnspezifische Marker wie die P-Granulae werden nicht segregiert oder werden abgebaut.
- Das Zellteilungsmuster der Zellen kann verändert sein.
- Sekundär können auch die somatischen Zellen verändert sein.

In der Mutantensammlung von Ralf Schnabel (Schnabel *et al.*, 1991) wurden vier maternal letale *ts*-Mutanten gefunden, die den gesuchten Phänotyp haben. Sie wurden unter dem Begriff *cib*-Mutanten zusammengefasst. Die Bezeichnung *cib* steht für *changed identity of blastomeres* (veränderte Identität der Blastomeren) und berücksichtigt die Tatsache, dass das Schicksal der P-Zellen bei diesen Mutanten verändert ist. Am besten beschrieben ist bisher der Phänotyp von den Mutanten *cib-1(e2300)* und *cib-1(e2303)* (Schnabel und Schnabel, 1990). Zur Verdeutlichung werden die Ergebnisse aus dieser Veröffentlichung unten zusammengefasst dargestellt.

Die Mutanten *cib-1(e2300)* und *cib-1(2303)* sind bisher am besten beschrieben

Die temperatursensitive Phase der maternal letalen Mutante *cib-1(e2300)* fällt genau mit den Teilungen der P-Zelllinie zusammen, was eine Funktion des Gens während der Spezifizierung der Zellen nahe legt. P0 teilt sich in AB und P1, die Zellteilung der Zygote ist nicht verändert. Die Keimbahn wird wie in WT-Embryonen angelegt und die P-Granulae werden normal segregiert (Abbildung 1.2). Wie auch in anderen Mutanten (Schnabel und Schnabel, 1990) ist das Zellteilungsmuster der *cib-1*-Embryonen (Embryonen, die von einem für *cib-1* homozygoten Hermaphroditen abstammen) bei restriktiver Temperatur in allen Zellen gegenüber WT-Embryonen verlangsamt. Die generelle Verlangsamung der Zellteilungen ist genau wie abweichende Zellmorphologien bei vielen Mutanten bekannt. Auffällig ist die extreme Verlängerung der Inter-

phase von der P1-Zelle gegenüber der Interphase der AB-Zelle. Diese Verzögerung oder Pause vor der Zellteilung variiert und kann bis zu einer ganzen Zellzyklus-Länge dauern. Das entstehende 3-Zell-Stadium aus ABa, ABp und P1 ist charakteristisch für die Mutante und dauert deutlich länger (≥ 2 min.) als im WT-Embryo. Die Dauer dieser Pause hat einen Einfluss auf die nachfolgenden Teilungen der P-Zelllinie (siehe Abbildung 1.2, B1-B4). Wenn die Pause länger als 14 Minuten (min.) dauert, teilt sich die P1-Zelle selbst symmetrisch in zwei Zellen gleicher Größe. Ist die Pause kürzer (5 bis 14 min.), teilt sich P2 symmetrisch. Bei einer noch kürzeren Pause teilt sich erst P3 symmetrisch.

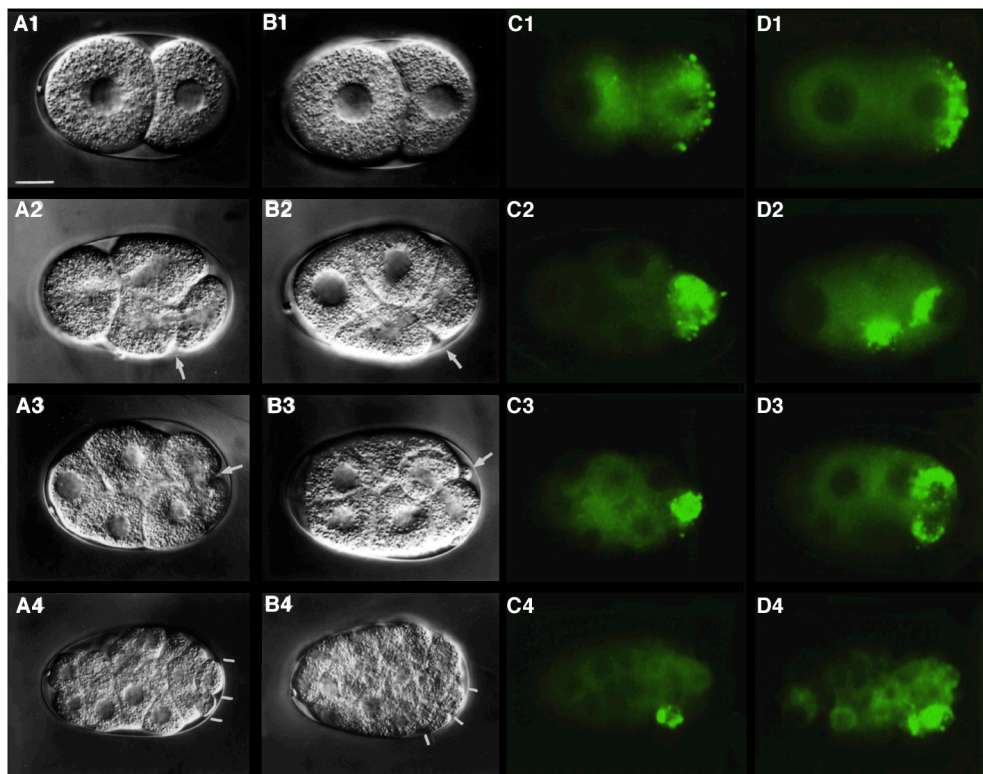


Abbildung 1.2: Im WT-Embryo (A1-A4) teilen sich die Zellen der P-Zelllinie asymmetrisch (weiße Pfeile), in der Mutante *cib-1(e2300)* dagegen symmetrisch (B1-B4, weiße Pfeile). Keimbahnspezifische Faktoren wie die P-Granulae werden im WT immer in die P-Zelle segregiert (C1-C4, grüne Punkte), nach einer symmetrischen Teilung in *cib-1*-Embryonen sind sie dagegen in beiden Tochterzellen nachweisbar (D1-D4, grüne Punkte). Abbildung modifiziert nach Schnabel und Schnabel (1990).

Das Schicksal der Keimbahnzellen ist entsprechend verändert, die P-Granulae werden auf beide Tochterzellen verteilt (Abbildung 1.2, D1-D4) und später abgebaut. Der Abbau der P-Granulae erfolgt im WT-Embryo nur nach einem versehentlichen Zurückbleiben in somatischen Zellen. DNA-Färbungen zeigten, dass sich die P1-Zelle

bis zum Ende der Pause in der G1-Phase befindet und dass erst danach die Synthese neuer DNA einsetzt. Diese Daten wurden durch Tubulinfärbungen der Spindel bestätigt. Ein weiteres Detail des interessanten Phänotyps wurde erst nach Lineageanalysen deutlich. Die P1-Zelle teilt sich nach einer langen Pause genau zu dem Zeitpunkt, an dem sich im WT-Embryo ihre Tochterzelle EMS teilt. Mit Immunfluoreszenz (siehe Material und Methoden, Kapitel 4.4, S. 124) wurden die Schicksale der Zellen überprüft. Die P1-Zelle hat den Keimbahncharakter verloren und exekutiert das Schicksal ihrer somatischen Tochter EMS, P1 nimmt das unterliegende Schicksal an. Nach einer kürzeren Pause nimmt P2 das unterliegende Schicksal an usw. Die Zellzyklus-Kontrolle spielt eine entscheidende Rolle für die Spezifizierung des P-Zell-Schicksals in der Mutante *cib-1(e2300)*, da die Dauer der Pause mit dem beobachteten Phänotyp korreliert. Das spätere Zellteilungsmuster der AB-Zelllinie ist ebenfalls stark verlangsamt. Dies kann, wie oben beschrieben, eine sekundäre Folge der veränderten P-Zelllinie sein oder auf eine pleiotrope Funktion des Gens hinweisen. Ähnlich lassen sich Zellteilungsprobleme erklären, die kurz vor dem Ende der Entwicklung auftreten. Die Embryonen entwickeln terminal ca. 100 Zellen und sterben dann. In der hier beschriebenen Veröffentlichung (Schnabel und Schnabel, 1990) wurde postuliert, dass *cib-1* eine der Determinanten für die autonome P-Zell-Spezifizierung sein kann und die embryonale Zellzyklus-Uhr (*developmental clock*, Dan und Ikeda, 1971) reguliert.

Das Gen *cib-1* wurde von Ralf Schnabel auf dem linken Arm von Chromosom I neben den phänotypischen Markern *unc-38* und *dpy-5* kartiert (Schnabel und Schnabel, 1990). Der molekulare Hintergrund für diesen interessanten Phänotyp war zu Beginn dieser Arbeit (2002) noch nicht bekannt.

Weitere Mutanten in den Genen *cib-2*, *cib-3* und *cib-4*

Neben den Mutanten *cib-1(e2300)* und *cib-1(e2303)* wurden noch drei weitere Mutanten aus der Sammlung des Schnabel-Labors isoliert, die den *cib*-Phänotyp zeigen. Die Gene *cib-2* und *cib-3* wurden zu demselben Zeitpunkt entdeckt wie *cib-1*. Erst 2004 wurde *cib-4* nach Arbeiten von Juan Cabello und Ufuk Günesdogan als *cib*-Mutante klassifiziert. *cib-4* wird in dieser Arbeit nicht näher untersucht. Claudine Eder hat in ihrer Diplomarbeit (Eder, 1990) *cib-2* charakterisiert. Die Embryonen der Mutante haben einen ähnlichen Phänotyp wie *cib-1*-Embryonen, allerdings wurden symme-

trische Teilungen nur in P2 und P3 beobachtet. Das Gen hat eine zweite, zygotische Funktion in den adulten Keimbahnzellen, die Hermaphroditen sind bei 25°C steril. Die Mutante *cib-3(e2280)* wurde als interessant empfunden, weil in der EMS-Zelllinie Veränderungen gegenüber WT beobachtet wurden. Richard Feichtinger hat die Mutante *cib-3(e2280)* in seiner Diplomarbeit phänotypisch charakterisiert und das Gen kartiert (Feichtinger, 1990). Dabei beobachtete er symmetrische Teilungen in P2 und P3 und ordnete die Mutante in die *cib*-Mutanten ein. Die Vorarbeiten zu den Mutanten in den Genen *cib-2* und *cib-3* werden im Ergebnisteil dieser Arbeit zusammengefasst dargestellt (siehe Kapitel 2.19, S. 88 und 2.8, S. 44).

Alle vier *cib*-Mutanten erfüllen die oben postulierten Kriterien. Die *cib*-Gene scheinen unmittelbar am Erhalt des Stammzellcharakters beteiligt zu sein, da in den Embryonen die P-Zelllinie beeinträchtigt ist. Eine Charakterisierung der Gene verspricht neue Einblicke in die Prozesse, die am Erhalt der Keimbahn beteiligt sind.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Der Prozess, der die Entwicklung der Keimbahn in Embryonen steuert, ist bisher unbekannt. Um den molekularen Hintergrund für diesen Prozess zu verstehen, werden maternal letale ts-Mutanten von *C. elegans* untersucht. Der Phänotyp der *cib*-Mutanten erfüllt vier Kriterien (siehe Kapitel 1.3), die sich aus dem Vorwissen über die Embryonalentwicklung ergeben und eine Funktion der betroffenen Gene während der Keimbahnentwicklung andeuten. In dieser Arbeit wird die Funktion der Gene *cib-1*, *cib-2* und *cib-3* genauer untersucht.

Die Ergebnisse aus verschiedenen Vorarbeiten, die von anderen Wissenschaftlern mit den Mutanten in den drei Genen durchgeführt wurden, wurden für diese Arbeit verwendet. So ist der Phänotyp der Mutanten *cib-1(2300)* und *cib-1(e2303)* bereits von Ralf Schnabel beschrieben und eine erste Kartierung durchgeführt worden (Schnabel und Schnabel, 1990), das Gen wurde 2003 von Henning Schmidt kloniert. Die Phänotypen der Mutanten in *cib-2* und *cib-3* wurden von Claudine Eder und Richard Feichtinger in Diplomarbeiten (Eder, 1990; Feichtinger, 1990) charakterisiert. Das Gen *cib-2* konnte erst 2006 von Henning Schmidt in diesem Labor kloniert werden.

Die weiterführenden Arbeiten an allen drei Mutanten zur Beschreibung der Genfunktionen sind das Hauptziel dieser Arbeit. In den Mutanten *cib-1(e2300)* und *cib-1(e2303)* wurde der Zusammenhang zwischen der Keimbahnentwicklung und der Zellzyklus-Kontrolle während der Embryogenese erforscht. Die Mutante *cib-3(e2280)* wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert, und die Funktion des Gens während der Embryonalentwicklung von *C. elegans* wurde charakterisiert. Der Einfluss von CIB-3 und seinen Interaktionspartnern auf die Zellschicksale in der P-Zelllinie vor und nach asymmetrischen Zellteilungen wurde gezeigt. Im letzten Abschnitt dieser Arbeit wird das Gen *cib-2* mit den beiden anderen Genen verglichen und in einen neuen Prozess eingeordnet, der auch für die Keimbahnentwicklung von adulten Keimbahnzellen relevant ist.

Nach der Beschreibung der drei Genfunktionen werden in der Diskussion verschiedene neue Prozesse beschrieben. Es wird eine Hypothese aufgestellt und diskutiert, wie die Zellzyklus-Kontrolle und die Asymmetrie in der Zellteilung gemeinsam für die Entwicklung der Keimbahn im Embryo von *C. elegans* notwendig sind.

2 Ergebnisse

cib-1

Die Mutanten *cib-1(e2300)* und *cib-1(e2303)* sind vor Beginn dieser Arbeit bereits sehr gut charakterisiert worden. Das Gen wurde als erstes von den drei *cib*-Genen kloniert und wird daher im Ergebnisteil dieser Arbeit als erstes vorgestellt.

2.1 Der Phänotyp der Mutanten ist sehr variabel

In der Veröffentlichung von Schnabel und Schnabel (1990) wurde der Phänotyp der Mutanten *cib-1(e2300)* und *cib-1(e2303)* erstmals beschrieben (siehe Kapitel 1.3, S. 10). Der Phänotyp variiert in verschiedenen Punkten, wie z.B. der Verzögerung der Zellzyklus-Länge in der P1-Zelle oder der Zellgeneration, in der es zu einer symmetrischen Zellteilung kommt. Um die Variabilität genauer zu charakterisieren, wurden in der vorliegenden Arbeit mutante, temperatursensitive Embryonen von verschiedenen Stämmen bei restriktiver Temperatur am 4D-Mikroskop aufgenommen und ausgewertet. Mit dieser Methode wurde gleichzeitig untersucht, ob sich die verschiedenen Stämme während der Kryokonservierung über fast 15 Jahre verändert hatten. Fünf Stämme mit verschiedenen, temperatursensitiven Allelen (*e2300*, *e2301*, *e2302*, *e2304* und *e2305*) wurden aufgetaut und zweimal gegen den WT-Stamm (N2, Bristol) ausgekreuzt, um den Einfluss zusätzlicher Mutationen oder epigenetischer Veränderungen so weit wie möglich zu reduzieren. Von allen fünf Stämmen wurden mehr als 50 Embryonen aufgenommen und ausgewertet. Die Varianz des Phänotyps ist sehr groß und abhängig von dem jeweiligen Embryo. Um die Funktion des Gens *cib-1* in der embryonalen Keimbahnentwicklung zu bestimmen, wurde das Gen nach verschiedenen Vorarbeiten durch Henning Schmidt in diesem Labor kloniert.

2.2 Klonierung des Gens *cib-1*

Das Gen *cib-1* wurde von Ralf Schnabel auf dem linken Arm von Chromosom I neben den phänotypischen Markern *unc-38* und *dpy-5* kartiert. Nach einer weiteren Kartierung von Thomas Wilm wurde das Gen zur molekularen Analyse von Henning Schmidt und Jasmin Fetisch kloniert.

Kartierung und Klonierung des Gens *cib-1*

Henning Schmidt und Jasmin Fetisch führten zur genaueren Kartierung des Gens *cib-1* eine SNP-Kartierung durch (siehe Material und Methoden, Kapitel 4.4, S. 126). Diese Kartierungsmethode nutzt die Unterschiede in einzelnen Nukleotiden der DNA-Sequenzen, den *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), zwischen verschiedenen WT-Isolaten von *C. elegans* wie dem N2-Stamm aus Bristol und CB4856 aus Hawaii. So konnte die Position des Gens *cib-1* auf den Teil A des YACs Y110A7 eingegrenzt werden (siehe Abbildung 2.1).

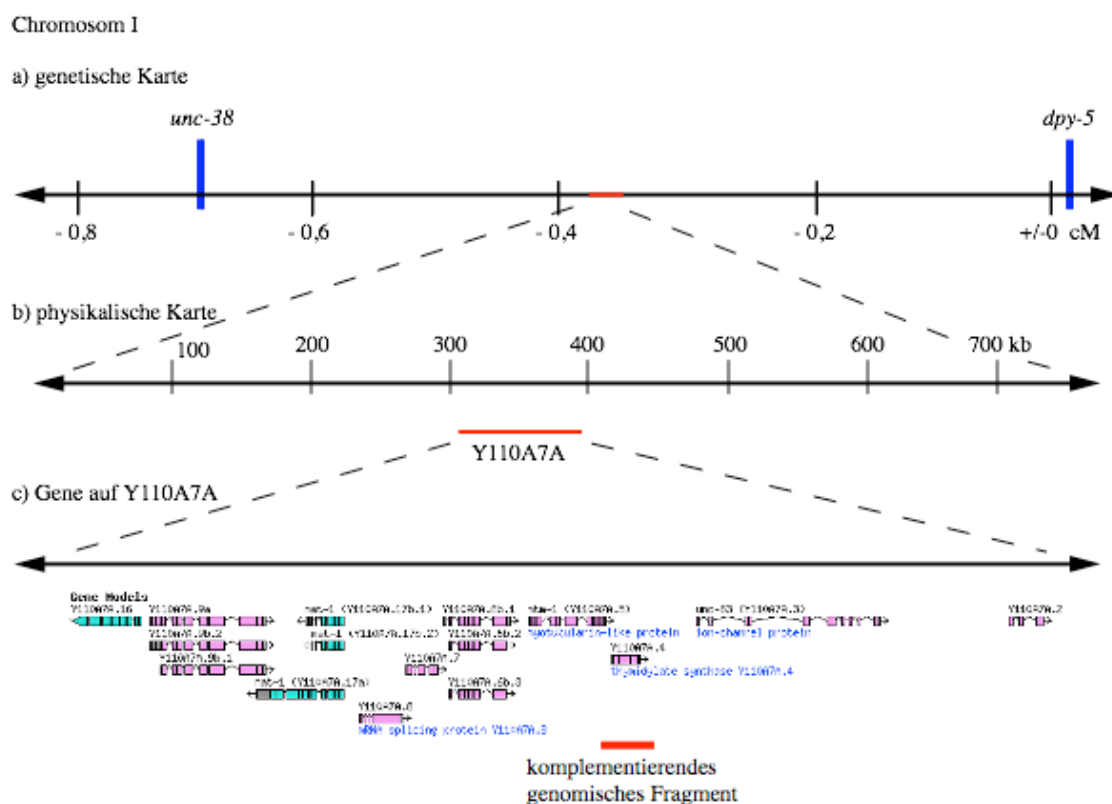


Abbildung 2.1: Die Position von *cib-1* auf Chromosom I. a) Das Gen wurde auf der genetischen Karte zwischen *unc-38* und *dpy-5* positioniert. b) Nach der SNP-Kartierung lässt sich die Lage des Gens auf der physikalischen Karte eingrenzen. Der YAC Y110A7A komplementiert die Mutante. c) Von den Genen auf dem YAC ist das Gen Y110A7A.4 mutiert. Ein genomisches Fragment mit diesem Gen komplementiert die Mutante.

Der YAC Y110A7A komplementiert die Mutante *cib-1(e2300)*. Sequenzierungen der DNA zeigen eine Mutation in ORF Y110A7A.4 an Position 241 der cDNA (das Nukleotid G wird durch T ersetzt). An dieser Stelle wird im Protein statt der Aminosäure Tryptophan (W) im WT ein Cystein (C) in der Mutante translatiert (siehe

Abbildung 2.3, S. 19). Besonders der Tausch einer beliebigen Aminosäure in einem Protein zu Cystein führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer anderen Sekundärstruktur, da z.B. Schwefelwasserstoff-Brückenbindungen ausgebildet werden können. So kann der temperatursensitive Phänotyp einer Mutante entstehen. In der nichtkonditionalen Mutante *cib-1(e2303)* wird Glutaminsäure (E) statt Valin (V) in das Protein eingebaut (siehe Abbildung 2.3, S. 19). Die Mutation befindet sich an Position 314 der cDNA (T zu A). Die Sequenzanalysen der übrigen, temperatursensitiven Allele von *cib-1* zeigen keine weitere Mutation, sie sind identisch mit der Mutante *cib-1(e2300)*. Die verschiedenen Stämme des Allels *cib-1(e2300)*, die ursprünglich für verschiedene Allele gehalten wurden, sind dabei jeweils im Phänotyp sehr variabel (vgl. Kapitel 2.1).

Ein genomisches Fragment dieses Gens Y110A7A.4 komplementiert bei 25°C ebenfalls die Mutante *cib-1(e2300)*. Zusammen zeigen die Komplementation und die Sequenzierungen eindeutig, dass *cib-1* das Gen Y110A7A.4 ist. In verschiedenen Datenbanken wurden im Rahmen dieser Arbeit ausführliche Sequenzanalysen durchgeführt, um Hinweise auf die Funktion des Gens zu bekommen.

Das Gen *cib-1* codiert für die Thymidylat-Synthase

Der ORF Y110A7A.4 codiert nach den Angaben in der Datenbank *wormbase* für ein 1.160 bp langes Transkript, das durch verschiedene ESTs (*expressed sequence tags*) bestätigt wird. Es codiert für ein 312 Aminosäuren (AS) großes, in sehr vielen Organismen konserviertes Protein (siehe Abbildung 2.3, S. 19, konservierte AS in gelb unterlegt) mit einer einzigen bekannten Domäne, der Thymidylat-Synthase-Domäne. Der konservierte funktionelle Bereich der Proteinsequenz beginnt in *C. elegans* bei Aminosäure 26 und erstreckt sich über das gesamte Protein. In anderen Organismen, wie dem Menschen (Kaneda *et al.*, 1990) und vor allem *Lactobacillus casei* (Takeishi *et al.*, 1985), sind die Struktur des Enzyms und die Funktion seiner hochkonservierten AS bereits intensiv untersucht worden (siehe Finer-Moore *et al.* (2003) und Abbildung 2.2). Das Enzym ist essentiell für die Nukleotidsynthese von dTTP und methyliert Desoxyuridylat (dUMP) zu Thymidylat (dTMP). Die übertragene CH₂-Gruppe stammt von Methylentetrahydrofolat (CH₂H₄Folat), das während der Reaktion zu Dihydrofolat (H₂Folat) umgesetzt wird.

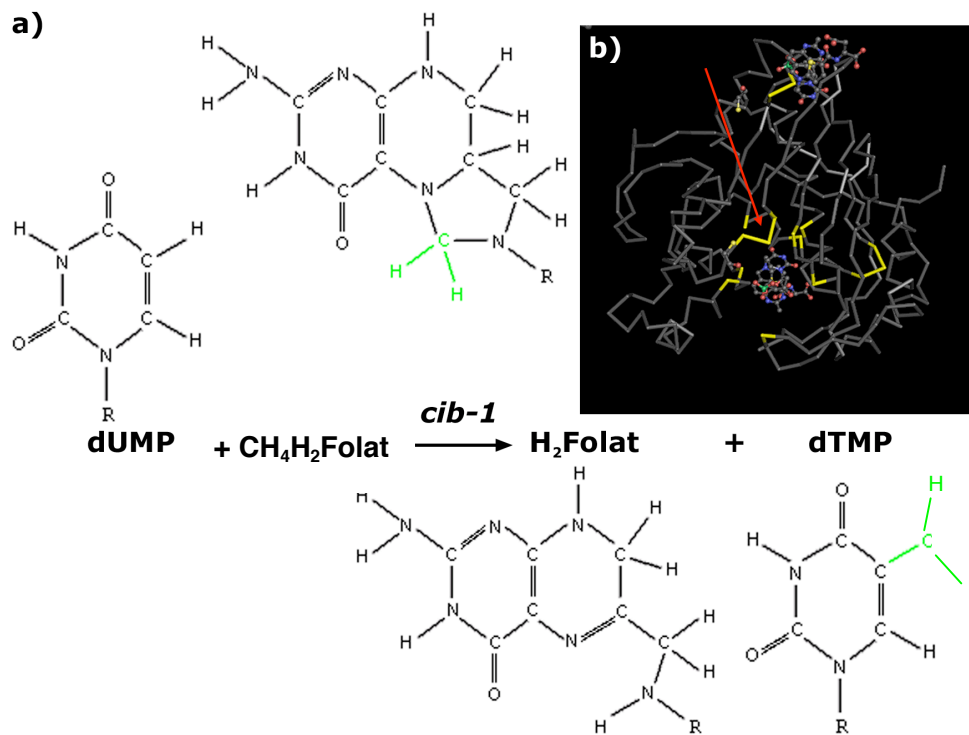


Abbildung 2.2: Die Thymidylat-Synthase *cib-1* methyliert dUMP zu dTMP. Der Cofaktor CH₂H₄Folat liefert die CH₂-Gruppe (grün) und wird zu H₂Folat umgesetzt. a) Reaktionsgleichung und Strukturformeln b) Modell der humanen Thymidylat-Synthase (<http://expasy.org/sprot/>) mit Substrat. Die funktionell konservierten Aminosäuren sind gelb markiert (siehe auch Abbildung 2.3, S. 19). Am aktiven Zentrum (roter Pfeil) beginnt die Reaktion.

Nach gerichteter Mutagenese werden einige konservierte AS des Enzyms in der Literatur als besonders wichtig beschrieben. Das funktionelle Enzym bindet zunächst an das Substrat dUMP über vier Arginine (siehe Abbildung 2.3, S. 19, grün markiert). Die Substratspezifität der Synthase wird durch ein Asparagin (pink) sichergestellt, das z.B. die Bindung von dCMP verhindert. Nach einer Konformationsänderung kann der Cofaktor CH₂H₄Folat gebunden werden (Bindungsstellen blau markiert), von dem eine CH₂-Gruppe am Aktiven Zentrum (rot markiert) auf das Substrat übertragen wird. H₂Folat wird nach der Übertragung eines Protons auf Glutaminsäure (blau gestrichelt) freigesetzt. Das Reaktionsprodukt dTMP steht für den nächsten Syntheseschritt zur Verfügung und das Enzym Thymidylat-Synthase wird wieder verwendet.

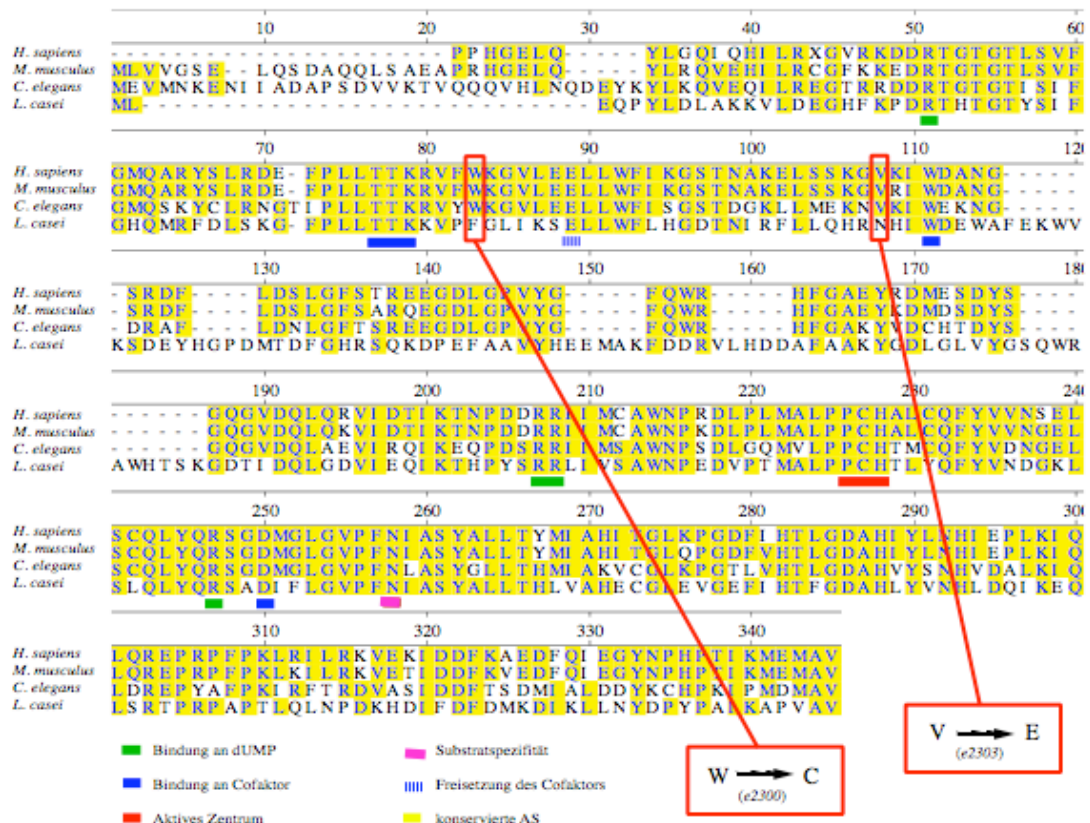


Abbildung 2.3: Die beiden Mutationen (rot umrandet) in *cib-1* liegen in der Thymidylat-Synthase-Domäne (AS 26-312) jeweils in der Nähe von konservierten AS, die an der Bindung des Cofaktors $\text{CH}_2\text{H}_4\text{Folat}$ beteiligt sind. Das Enzym ist in den verschiedenen Organismen wie z.B. Mensch, Maus und Bakterien stark konserviert (gelb unterlegt). Funktionelle AS sind an der Bindung des Substrats dUMP (grün markiert) oder des Cofaktors (blau) beteiligt. Die Substratspezifität des Enzyms wird durch ein Asparagin (pink) sichergestellt. Die CH_2 -Gruppe wird am Aktiven Zentrum (rot) auf das Substrat übertragen, der umgesetzte Cofaktor nach einer Protonübertragung zu Glutaminsäure (blau gestrichelt) freigesetzt.

Im Genom von *C. elegans* ist *cib-1* das einzige Gen, das eine konservierte Thymidylat-Synthase-Domäne enthält. Die temperatursensitive Mutation liegt in unmittelbarer Nähe zu einer konservierten Bindungsstelle für den Cofaktor, die nichtkonditionale Mutation liegt nicht weit von einem weiteren Bestandteil der Cofaktor-Bindungsstelle. Beide Mutationen könnten die Bindung des Enzyms an den Cofaktor beeinträchtigen, auch wenn die wichtigsten konservierten AS selbst nicht mutiert sind.

In Winska *et al.* (2005) konnte die Enzymaktivität der Thymidylat-Synthase aus *C. elegans* nach einer Aufreinigung des nativen Proteins aus Wurmlysaten bestätigt werden. Die mRNA und das Protein sind biochemisch in allen Stadien nachweisbar, allerdings ist die Menge von beiden in Dauerlarven (als nicht proliferierendem Stadium) reduziert. Die Arbeitsgruppe (s. o.) hat verschiedene Enzyme der Thymidylat-Synthase

(siehe unten, Thymidylat-Synthese) untersucht, um die Ähnlichkeit zwischen *C. elegans* und *Trichinella spiralis* bzw. *T. pseudospiralis* zu belegen und so ein Modellsystem zur Bekämpfung von Trichinellose (Trichinenbefall in Skelettmuskulatur) zu etablieren. *In vivo* sind bisher keine Experimente zur Thymidylat-Synthase in *C. elegans* durchgeführt worden, und Mutanten sind nicht bekannt.

Zusammengefasst codiert das Gen *cib-1* für die Thymidylat-Synthase Y110A7A.4 in *C. elegans*. Das Protein ist sehr konserviert und in anderen Organismen bereits gründlich untersucht worden. Die Synthase-Domäne ist funktionell und katalysiert eine Reaktion bei der Thymidylat-Synthase.

Die Aktivität der Thymidylat-Synthase *cib-1* wurde *in vitro* bestätigt

Das Enzym Thymidylat-Synthase ist an der Synthese des DNA-Bausteins dTTP beteiligt (siehe Abbildung 2.4). Die meisten Enzyme, die bei den Biosynthesewegen von RNA- bzw. DNA-Nukleotiden verwendet werden, können während der Herstellung von verschiedenen Nukleotiden identische Reaktionsschritte katalysieren (siehe auch Kapitel 2.4, S. 31). Sie werden deshalb mehrfach eingesetzt, wie z.B. die Ribonukleotid-Reduktase. Dieses Enzym kann alle Ribonukleotide zu Desoxyribonukleotiden reduzieren. Bei drei Desoxyribonukleotiden (dATP, dGTP und dCTP) ist dies der letzte Schritt für die Fertigstellung der dNTPs. dTTP stellt einen Sonderfall bei der Nukleotidsynthese dar (siehe Abbildung 2.4), da in der RNA kein Thymidin, sondern Uracil verwendet wird. Die Ribonukleotid-Reduktase (s. o.) reduziert so Uridintriphosphat (UTP) zu Desoxyuridylat (dUTP). Die weitere Synthese zu dTTP übernehmen Enzyme, die nur an einer einzigen Reaktion beteiligt sind. dUTP wird durch eine dUTP-Pyrophosphatase zu Desoxyuridylat (dUMP), das durch die oben beschriebene Thymidylat-Synthase *cib-1* zu dTMP methyliert wird. Ein weiteres singuläres Enzym ist die Thymidylatkinase, die dTMP zu Thymidindiphosphat (dTDP) phosphoryliert. Der letzte Schritt der Synthese von dTTP aus dTDP wird wieder von einem universellen Enzym übernommen, die Nukleosiddiphosphat-Kinase kann alle Desoxy- und Ribonukleosiddiphosphate phosphorylieren. Für alle drei Enzyme in *C. elegans*, die nur an der dTTP-Synthese beteiligt sind, wurde die Enzymaktivität in Zelllysaten an dem spezifischen Substrat nachgewiesen (Winska *et al.*, 2005).

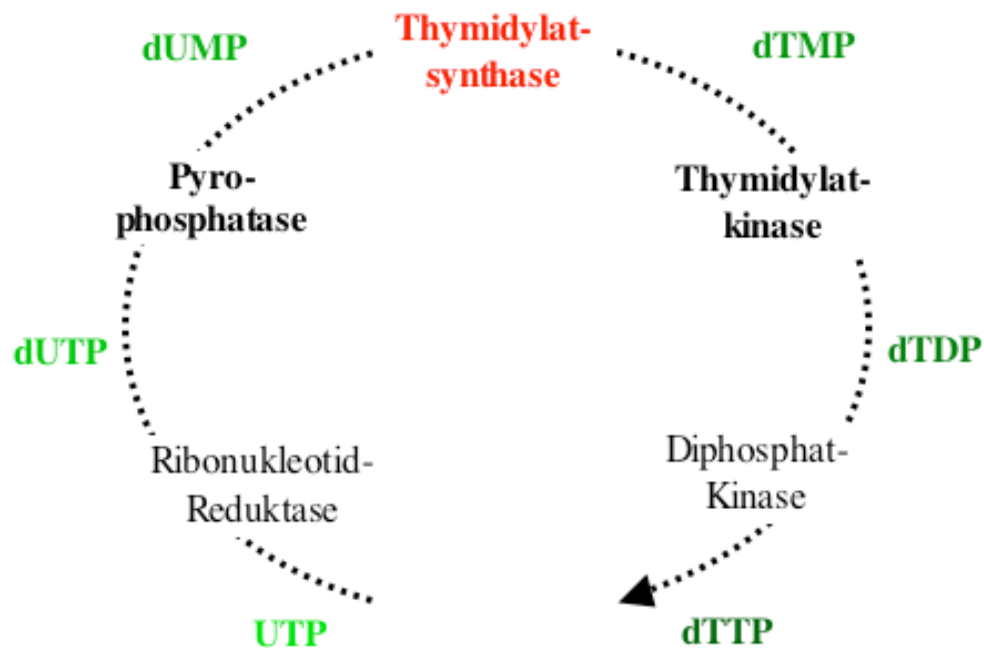


Abbildung 2.4: Die Synthese von dTTP aus UTP (grün) und die daran beteiligten Enzyme (schwarz bzw. rot). Alle Ribonukleotide werden von der Ribonukleotid-Reduktase reduziert, z.B. UTP zu dUTP. Nur bei der dTTP-Synthese muss das entstandene Molekül von drei singulären Enzymen (fett gedruckt) weiter umgebaut werden. dUTP wird durch die dUTP-Pyrophosphatase zu dUMP, das von der Thymidylat-Synthase (rot) zu dTMP methyliert wird. Die Thymidylat-Synthase ist von den Mutationen in dem Gen *cib-1* in *C. elegans* verändert. Die Thymidylatkinase phosphoryliert dTMP zu dTDP. Den letzten Schritt zur dTTP-Synthese übernimmt die universelle Nukleosiddiphosphat-Kinase.

Nach der Klonierung des Gens *cib-1* wurden zwei verschiedene Mutationen identifiziert. Der ORF Y110A7A.4 zeigt unerwartet große Homologien zur Thymidylat-Synthase. Das Enzym katalysiert eine Reaktion bei der sehr konservierten und gut untersuchten Synthese des Nukleotids dTTP. Das Gen wurde in RNAi-Experimenten eingesetzt, um den Phänotyp der Mutanten zu kopieren.

2.3 *cib-1*-RNAi verursacht den gleichen Phänotyp wie *cib-1(e2300)*

In dieser Arbeit wurden RNAi-Experimente (siehe Material und Methoden 4.4, S. 126) in dem WT-Stamm und in der Mutante *cib-1(e2300)* durchgeführt. Bei dieser Methode wird doppelsträngige RNA (dsRNA) des betreffenden Gens in die Gonaden der Hermaphroditen injiziert. In den Embryonen der F1-Generation interferiert die dsRNA mit dem spezifischen endogenen Transkript (*RNA mediated interference*, Fire *et al.*, 1998) und der entstehende RNA-Doppelstrang wird abgebaut. Die Reduzierung der Menge an endogener mRNA mit dieser Methode wird auch als *knock-down* eines Gens

bezeichnet. Die Wirkung der injizierten RNA ist von Gen zu Gen verschieden und meist zeitabhängig.

Kopie des Phänotyps von *cib-1*-Embryonen durch *cib-1*-RNAi in Wildtyp

Um die Wirkung von *cib-1*-RNAi festzustellen, wurde dsRNA von *cib-1* in junge, adulte WT-Hermaphroditen injiziert. Ab 18 h nach der Injektion wurde bei 25°C ein embryonal letaler Phänotyp beobachtet. Die Embryonen der F1-Generation wurden unter dem 4D-Mikroskop aufgenommen (siehe Abbildung 2.5) und mit homozygoten *cib-1(e2300)* Embryonen verglichen. Der Phänotyp der Embryonen ist abhängig von der Zeit, die von der Injektion bis zur Befruchtung vergeht. Der RNAi-Effekt nimmt über die Zeit zu. Je länger die Injektion zurückliegt, desto früher nach der Befruchtung entwickeln die Embryonen die RNAi-Defekte.

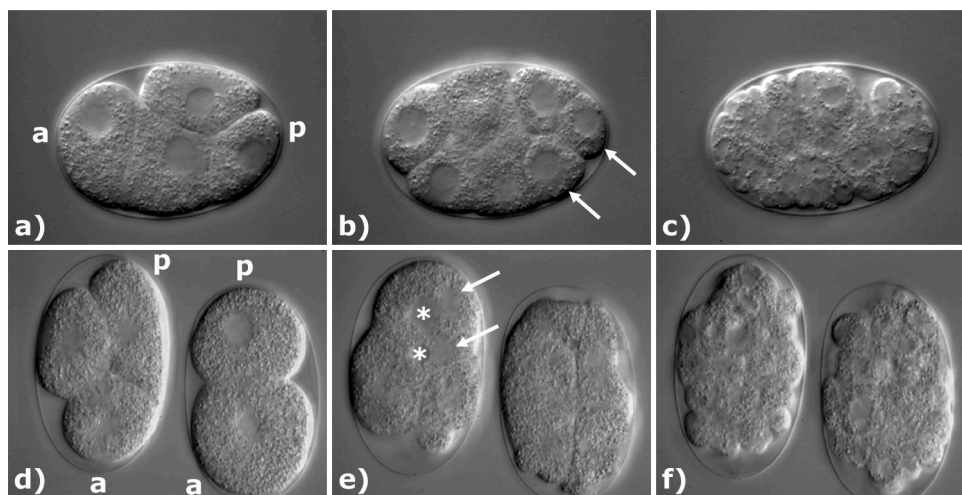


Abbildung 2.5: WT-Embryonen mit *cib-1*-RNAi. a) – c) Der Embryo wurde 20 h nach der Injektion aufgenommen. Er bildete ein weitgehend normales 4-Zell-Stadium (a), aber die P2-Zelle teilte sich symmetrisch. b) Die Zellen C und P3 waren gleich groß (weiße Pfeile). c) zeigt den terminalen Phänotyp mit ca. 200 Zellen. d) – f) Die beiden Embryonen wurden 36 h nach der Injektion aufgenommen. Die frühen Stadien sahen normal aus (d), danach traten starke Teilungsprobleme auf. (e) Teilweise hat eine Zelle mehrere Zellkerne (weiße Sterne) und ektopische Spindeln (weiße Pfeile). Die Zellen versuchten immer wieder sich zu teilen, so dass bis zu den terminalen Phänotypen (f) ca. 150 Zellen gebildet wurden. Anterior (a) und posterior (p) sind in a) und d) markiert.

Die meisten *cib-1*-RNAi-Embryonen starben mit 150 bis 200 Zellen, also etwas später als die Mutanten. Das 2-Zell-Stadium wurde in Embryonen 20 h nach der Injektion normal gebildet (Abbildung 2.5a). In vielen Fällen wurde eine Verlängerung der Interphase in der P-Zellinie gegenüber der AB-Zellinie beobachtet, eine symmetrische Zellteilung wurde nur in einem Fall beobachtet (Abbildung 2.5b, weiße Pfeile). Der

RNAi-Phänotyp entspricht dem Phänotyp von *cib-1(e2300)*-Embryonen. 36 h nach der Injektion wurden die letzten Oozyten in den Hermaphroditen befruchtet. Diese späten Embryonen zeigten ebenfalls keine Defekte bis zum 2-Zell-Stadium (Abbildung 2.5d). Nach diesem Stadium traten starke Teilungsprobleme auf, die z. T. zu polynukleären Zellen mit ektopischen Spindeln führten. Die Zellen konnten sich trotz dieser Probleme später weiter teilen, bis die Embryonen mit ca. 150 Zellen starben. Dieser Phänotyp ist dem von *cib-1(e2303)*-Embryonen sehr ähnlich.

Durch die zeitabhängige Wirkung der dsRNA von *cib-1* in WT-Hermaphroditen konnten die Phänotypen von *cib-1(e2300)* und *cib-1(e2303)* kopiert werden. Die Methode des RNAi eignet sich gut, um die Funktion des Gens *cib-1* zu untersuchen. Deshalb wurde die Restfunktion des Gens in der Mutante *cib-1(e2300)* mit RNAi weiter reduziert, um den Phänotyp von Embryonen ohne CIB-1 zu untersuchen.

Reduktion der Genfunktion mit RNAi von *cib-1* in *cib-1(e2300)*

Die Analyse von Mutanten ermöglicht die Charakterisierung der Genfunktion von *cib-1*. Ein wichtiger Aspekt ist hierbei der Zeitpunkt der Entwicklung, an dem das Genprodukt zum ersten Mal eine Funktion übernimmt. Am einfachsten lässt sich dieser Zeitpunkt mit Hilfe eines Deletionsallels bzw. *knock-out*-Allels, bei dem das ganze Gen *cib-1* fehlt, bestimmen. Bisher ist kein Deletionsallel von *cib-1* bekannt, und es wurden verschiedene Alternativen gesucht, um dennoch die früheste Funktion des Gens *cib-1* festzustellen.

In der Veröffentlichung über das Gen *cib-1* (Schnabel und Schnabel, 1990) wird beschrieben, dass der Phänotyp der Mutanten sehr stark von der Dosis des Genprodukts abhängt. In Kreuzungsexperimenten wurden beide Allele jeweils in trans zu der Defizienz *sDf4* gebracht. *sDf4* ist eine Deletion auf Chromosom I und wurde etwa in der Position von -3,0 cM bis 0,9 cM kartiert, es liegen also mehrere Gene und *cib-1* unter der Defizienz. Die heterozygoten Embryonen zeigten immer den typischen *cib*-Phänotyp, die Teilung der Zygote war nicht beeinträchtigt. Nach diesen Experimenten wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Genprodukt in beiden Allelen keine Funktion mehr übernehmen kann. Der Phänotyp der Mutanten zeigt demnach den Zeitpunkt, an dem das Gen zum ersten Mal eine Funktion übernimmt.

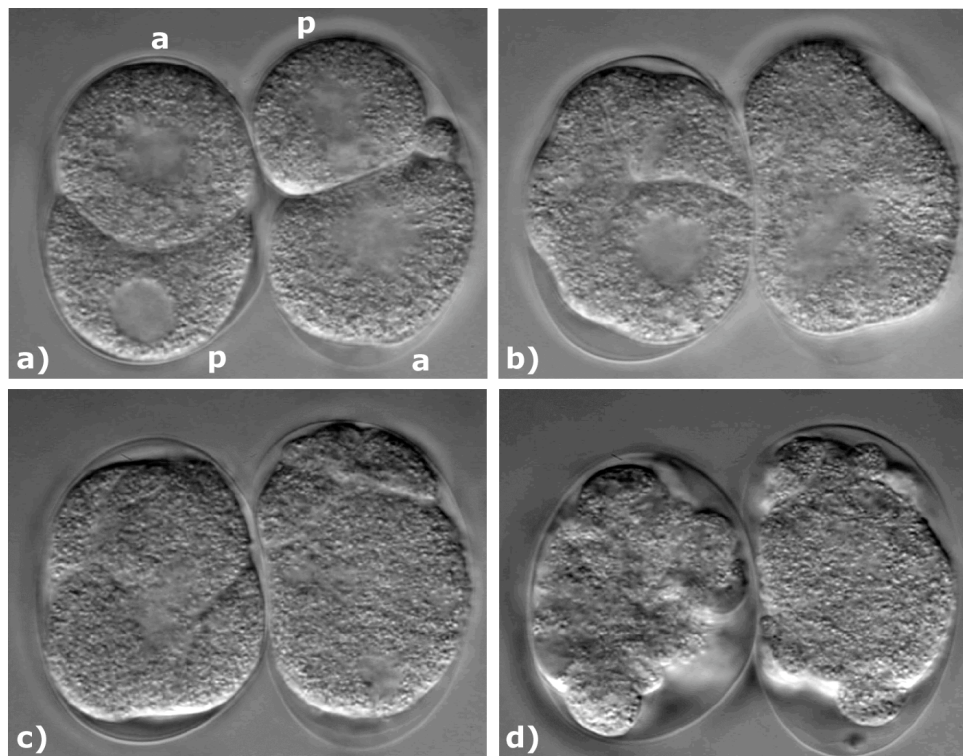


Abbildung 2.6: *cib-1(e2300)*-Embryonen mit *cib-1*-RNAi 20 h nach der Injektion. a) Der linke Embryo entwickelte ein normales 2-Zell-Stadium, aber in dem rechten Embryo wurde in beiden Zellen die Kernmembran nicht aufgebaut. b) – d) Die Zellen hatten Teilungsprobleme und auch die Zellform war nicht vergleichbar mit WT-Zellen. Die Stadien entsprachen keinem bestimmten Muster und die Zellen teilten sich unkoordiniert. Eine Lineageanalyse dieser Embryonen ist nicht möglich, da manche Zellen keinen Zellkern bildeten und weitere Zellen wieder fusionierten. Anterior (a) und posterior (p) sind in a) gekennzeichnet.

Diese Hypothese wurde im Rahmen dieser Arbeit mit einem RNAi-Experiment getestet, die Injektion von *cib-1*-dsRNA sollte keinen Effekt auf den Phänotyp der *cib-1(e2300)*-Embryonen haben. Nach Injektion von *cib-1*-dsRNA in die Gonaden junger, adulter Hermaphroditen wurden die Embryonen am 4D-Mikroskop ausgewertet. Dabei ist der RNAi-Effekt zeitabhängig: Je später die Eier nach der Injektion in den Gonaden gebildet werden, desto früher tritt der RNAi-Effekt auf. Die Embryonen zeigten schon 20 h nach der Injektion starke Zellteilungsprobleme während der ersten Teilung (siehe Abbildung 2.6). Teilweise wurden die Kernmembranen nach der Teilung nicht aufgebaut, die Zellen waren verformt und die Membran zwischen den beiden Tochterzellen wurde nicht vollständig gebildet, so dass die Zellen wieder fusionierten. Außerdem legten die injizierten Hermaphroditen insgesamt ca. 20 % weniger Eier als andere, denen die Kontroll-dsRNA von *lin-17* injiziert wurden. Vermutlich ist ein *knock-out*-Allel von *cib-1* steril.

Der Phänotyp der beiden Mutanten *cib-1(e2300)* und *cib-1(e2303)* kann mit RNAi-Experimenten in WT-Hermaphroditen gut kopiert werden. Der Vergleich dieses Phänotyps mit dem von *cib-1(e2300)*-Embryonen nach *cib-1*-RNAi zeigt aber, dass keiner dieser Phänotypen der Nullfunktion des Gens entspricht. Wie der spezifische Phänotyp durch die Mutationen in *cib-1* ausgelöst wird, wird in Kapitel 2.6 und 2.7 untersucht. Vorher wird sichergestellt, dass die Mutationen wirklich die Funktion der Thymidylat-Synthase beeinträchtigen.

2.4 Zwei weitere Gene zeigen den gleichen RNAi-Phänotyp wie *cib-1*

Das Gen *cib-1* codiert nachweislich für die einzige homologe Thymidylat-Synthase im *C. elegans* Genom (Winska *et al.*, 2005). Bisher ist allerdings nicht nachgewiesen, ob die Mutationen *cib-1(e2300)* und *cib-1(e2303)* auch die Funktion dieses Enzyms beeinträchtigen. Die alternativen Hypothesen sind jedoch sehr unwahrscheinlich. So kann in dem bekannten ORF noch ein weiterer verborgen sein, der bisher nicht erkannt wurde. Spleißvarianten können eine andere Funktion haben oder das Protein übernimmt pleiotrope Funktionen. Um diese Möglichkeiten zu testen, wurden verschiedene Experimente durchgeführt.

Die dUTP-Pyrophosphatase löst nach RNAi den gleichen Phänotyp aus

Um zu testen, ob die Mutationen in *cib-1* die Thymidylat-Synthase verändern, wurden die anderen singulären Enzyme (siehe Kapitel 2.2, S. 20 und Abbildung 2.4, S. 21) mit RNAi untersucht. Die dUTP-Pyrophosphatase ist das erste singuläre Enzym in der dTTP-Synthese und katalysiert die Reaktion zur Herstellung von dUMP aus dUTP. dUMP ist das Substrat für die Thymidylat-Synthase CIB-1. Das einzige homologe Gen zur dUTP-Pyrophosphatase im Genom von *C. elegans* ist K07A1.2 auf Chromosom I bei ca. 3,80 cM. Aus zwei weiteren RNAi-Experimenten ist bereits bekannt, dass RNAi-Experimente von K07A1.2 einen embryonal letalen Phänotyp auslösen (Piano *et al.*, 2002; Sonnichsen *et al.*, 2005). Zur Überprüfung des Phänotyps und um einen Vergleich mit den letalen Embryonen von *cib-1(e2300)* und *cib-1(e2303)* zu ermöglichen, wurden RNAi-Experimente von K07A1.2 in WT-Hermaphroditen durchgeführt (siehe Kapitel 4.4, S. 126). Der RNAi-Effekt ist genau wie bei *cib-1* zeitabhängig und embryonal letale Phänotypen wurden ab 20 h bis 36 h nach der Injektion beobachtet.

Danach wurden keine Oozyten mehr befruchtet oder die Hermaphroditen waren steril. Die letalen Embryonen zeigten starke Defekte, ähnlich den Embryonen der Mutante *cib-1(e2303)* oder den *cib-1(2300)*-Embryonen mit RNAi von *cib-1*. Viele Embryonen bildeten ein normales 2-Zell-Stadium (Abbildung 2.7a, rechter Embryo), aber danach traten Teilungsprobleme auf (Abbildung 2.7b). Durch diese Probleme teilte sich z.B. die AB-Zelle in vier Zellen statt in zwei, oft konnten die entstehenden Stadien nicht mehr mit den WT-Stadien verglichen werden (Abbildung 2.7c). In seltenen Fällen wurden tote Embryonen isoliert, die wahrscheinlich schon während der Befruchtung starben (Abbildung 2.7a und b, linker Embryo). Symmetrische Teilungen in der P-Zelllinie wurden nicht beobachtet.

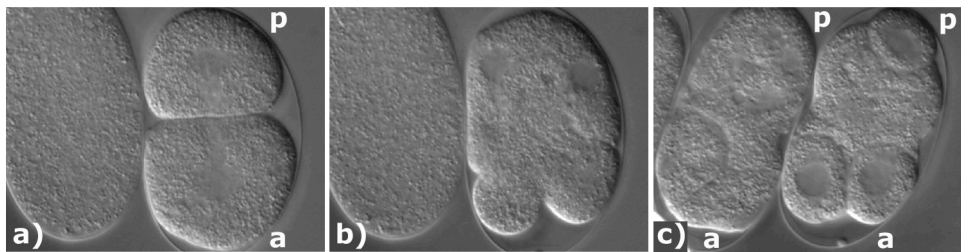


Abbildung 2.7: Nach RNAi-Experimenten mit K07A1.2 in WT wurden embryonal letale Embryonen aufgenommen, die teilweise den frühen *cib*-Phänotyp zeigten. a) Der rechte Embryo entwickelte ein weitgehend normales 2-Zell-Stadium. b) Der Embryo entwickelte sich mit starken Teilungsproblemen weiter. Der linke Embryo in a) und b) starb wahrscheinlich während der Befruchtung und besaß im Gegensatz zu unbefruchteten Oozyten eine Eischale. c) Die Embryonen ließen sich keinem bestimmten WT-Stadium mehr zuordnen. Anterior (a) und posterior (p) sind – soweit feststellbar – in a) und c) gekennzeichnet.

Der Phänotyp der Embryonen mit RNAi von K07A1.2 ähnelt dem von *cib-1*-Embryonen mit starken Defekten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass von beiden Genen derselbe Prozess vermittelt wird.

Auch die Thymidylatkinase löst nach RNAi den gleichen Phänotyp aus

Zur weiteren Bestätigung, dass alle an der dTTP-Synthese beteiligten singulären Enzyme den gleichen RNAi-Phänotyp verursachen, wurde auch die Thymidylatkinase mit RNAi untersucht. Das Enzym Thymidylatkinase vermittelt in dem Syntheseweg von dTTP die Reaktion unmittelbar nach CIB-1. Die Kinase ist das dritte und letzte singuläre Enzym des Synthesewegs und phosphoryliert dTMP zu dTDP. Im *C. elegans*-Genom wird sie von dem einzigen homologen Gen R53.2 auf Chromosom II bei 1,82 cM codiert. Bisher ist für die Thymidylatkinase kein RNAi-Phänotyp bekannt (Rual et

al., 2004; Sonnichsen *et al.*, 2005), der mit dem Phänotyp von *cib-1(e2300)* und *cib-1(e2303)* verglichen werden könnte. Zur Überprüfung des Phänotyps wurden von diesem ORF ebenfalls RNAi-Experimente durchgeführt und mit den anderen Aufnahmen verglichen. Nach Injektion von dsRNA in WT-Hermaphroditen zeigte sich – genau wie bei den beiden anderen Genen K07A1.2 und *cib-1* – ab 18 h nach der Injektion ein zeitabhängiger, embryonal letaler Phänotyp. Die meisten Embryonen entwickelten ein normales 2- bzw. 4-Zell-Stadium (Abbildung 2.8) und starben mit etwa 80 bis 100 Zellen terminal. In diesen Embryonen konnten die typischen symmetrischen Teilungen in der P-Zellinie beobachtet werden. Je später nach der Injektion ein Embryo präpariert wurde, desto früher wurden Defekte in der Embryogenese beobachtet. 30 h nach der Injektion zeigten die befruchteten Embryonen eines Hermaphroditen bereits ab dem 2-Zell-Stadium Teilungsprobleme. Später wurden keine Oozyten mehr befruchtet, nach 40 h ab der Injektion waren die Hermaphroditen steril.

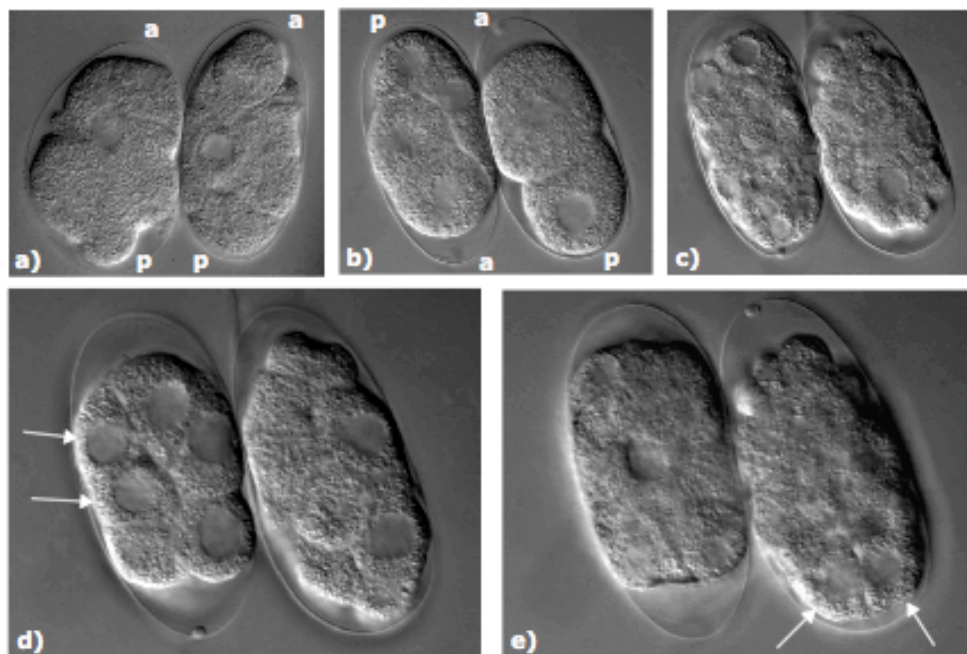


Abbildung 2.8: RNAi von R53.2. a) 30 h nach Injektion zeigten Embryonen schon ab dem 2-Zell-Stadium Teilungsprobleme. b) – e) Embryonen 18 h nach Injektion. b) Zu Beginn der Entwicklung war alles wie in WT-Embryonen. c) Terminaler Phänotyp mit ca. 100 Zellen. d) Im linken Embryo teilte sich P2 symmetrisch, C und P3 (weiße Pfeile) waren gleich groß. e) Im rechten Embryo teilte sich ebenfalls P2 symmetrisch, C und P3 (weiße Pfeile) waren gleich groß. Anterior (a) und posterior (p) sind gekennzeichnet.

Die Reduzierung von allen drei singulären Enzymen der dTTP-Synthese durch RNAi-Experimente verursacht den gleichen Phänotyp wie in den Mutanten *cib-1(e2300)* und

cib-1(e2303). Aus diesen Experimenten lässt sich schließen, dass der Phänotyp von den Mutanten in *cib-1* durch eine veränderte dTTP-Synthese verursacht wird. In den folgenden Experimenten soll diese Hypothese weiter getestet werden.

Eine Inhibition der Synthese bewirkt einen Phänotyp in der späten Embryogenese

Die Synthese von dTTP kann auf verschiedenen Ebenen inhibiert werden. So sind aus der Chemotherapie spezifische Inhibitoren für die Thymidylat-Synthase bekannt (Berg, 2003). Sie werden eingesetzt, um die stark proliferierenden Krebszellen an der Replikation zu hindern und damit auch an weiteren Zellteilungen. Der Inhibitor Fluorouracil (dFU) wird *in vivo* in Fluorodesoxyuridylat (F-dUMP) umgesetzt. F-dUMP bindet kompetitiv mit dUMP an die Thymidylat-Synthase und geht als Zwischenprodukt der Reaktion eine kovalente Bindung mit dem Enzym ein. Durch das gebundene Fluor wird eine weitere Spaltung des Cofaktors verhindert und das Enzym irreversibel gehemmt. dFU ist im Gegensatz zu den übrigen, komplexeren Inhibitoren sehr leicht erhältlich, deshalb wurde diese Chemikalie für die Experimente ausgewählt. Durch Injektion von verschiedenen Konzentrationen in die Gonaden junger, adulter WT-Hermaphroditen wurde untersucht, ob bei einer spezifischen Inhibition der Synthese *cib-1* mit dFU ein ähnlicher Phänotyp wie in der Mutante erzeugt werden kann. 15 Stunden nach der Injektion in die Gonaden junger, adulter WT-Hermaphroditen traten letale Embryonen auf. Nach Aufnahmen mit dem 4D-Mikroskop starben diese Embryonen zu einem viel späteren Zeitpunkt der Entwicklung als die Mutante *cib-1(e2300)*. Die Teilungen der P-Zellen verliefen wie im WT, dafür hatten die Embryonen Probleme beim Schließen der Hypodermis, bei der *ventral enclosure* (siehe Abbildung 2.9). Obwohl sich die Hypodermis nicht rechtzeitig schloß, begann die Elongation des Embryos zum gleichen Zeitpunkt wie im WT und alle innen liegenden Zellen wie z.B. die Darmzellen kamen nach außen. Ab dem ersten letalen Embryo nach der Injektion bis zum letzten befruchteten Ei der Hermaphroditen war der Phänotyp bei allen Embryonen gleich, die Embryonen starben alle in derselben Phase. Dieser Phänotyp ist typisch für späte Defekte in der Embryogenese. Er konnte auch beobachtet werden, wenn *cib-1(e2300)*-Embryonen erst ab dem 80-Zell-Stadium bei der restriktiven Temperatur aufgenommen wurden (pers. Mitteilung von Anja-Kristina Schulz).

Wenn der Inhibitor für die Thymidylat-Synthase nicht rechtzeitig und in ausreichender Menge kompetitiv an die Synthase bindet, ist eine Kopie des frühen Phänotyps der *cib-1*-Embryonen nicht möglich. Mit diesem Experiment konnte nicht eindeutig gezeigt werden, welche Folgen ein dTTP-Mangel auf die frühe Embryonalentwicklung hat. Statt auf der Ebene der Thymidylat-Synthase sollte die Replikation aber auch direkt terminiert werden, um die Auswirkungen auf die Embryonen zu beobachten.

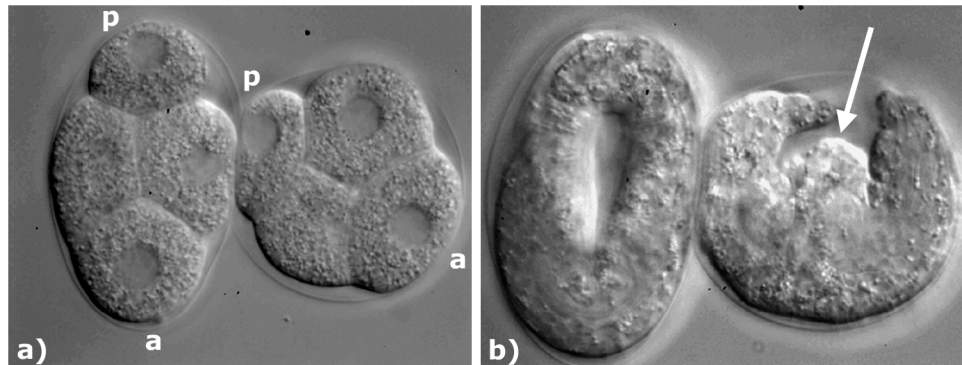


Abbildung 2.9: Zwei WT-Embryonen nach der Injektion von dFU. a) Nach der Injektion von dFU in WT-Hermaphroditen entwickelten sich die Embryonen zunächst normal. b) Die Hypodermis schloß sich jedoch nicht rechtzeitig vor Beginn der Elongation, der Darm kam während der Elongation nach außen (weißer Pfeil). Anterior (a) und posterior (p) sind in a) gekennzeichnet.

Die Termination der Replikation nach ddTTP-Injektion hat keine Wirkung

Die spezifische Inhibition der Synthase *cib-1* verursachte in den Embryonen nicht den typischen *cib*-Phänotyp. So wurde nach weiteren Möglichkeiten gesucht, um die Auswirkungen der Mutationen in dem Gen *cib-1* auf die dTTP-Synthese nachzuweisen. Eine ausreichende Menge an dTTP ist in jeder Zelle die Voraussetzung für die funktionierende Replikation und für die Zellteilung entsprechend des Zellzyklus. In den beiden Mutanten *cib-1(e2300)* und *cib-1(e2303)* und den verschiedenen RNAi-Experimenten ist die Synthese von dTTP wahrscheinlich herabgesetzt. Bei einer Termination der Replikation durch Didesoxyribose-Thymidintriphosphat (ddTTP) kann ein ähnlicher Phänotyp der Embryonen auftreten. Bei einem Einbau von ddTTP während der Replikation kommt es zu einem Abbruch der Synthese-Reaktion, da nach einem ddNTP kein weiteres dNTP mehr eingebaut werden kann. In einem entsprechenden Experiment wurden verschiedene Konzentrationen von ddTTP (100 μ M/ml, 1 mM/ml und 10 mM/ml) in die Gonaden von jungen, adulten WT-Hermaphroditen injiziert (siehe Material und Methoden 4.4, S. 126). Auch bei einer Zugabe in hohem Überschuss (un-

verdünnte Stammlösung von 10 mM/ml) wurde kein Effekt auf die Embryonen beobachtet.

Da sich der Phänotyp der Embryonen nicht änderte, ist auch ein technisches Problem bei der Versuchsdurchführung denkbar. So gibt es z.B. keinen zelleigenen Amplifikationsmechanismus von ddTTP ähnlich dem für dsRNA. Es wurde auch nicht nachgewiesen, ob das Didesoxynukleotid überhaupt in den Zellkern der Embryonen gelangt. Aus diesen Gründen ist das Ergebnis des Experiments nicht interpretierbar. Statt der weiteren Inhibition der dTTP-Synthese oder der Termination der Replikation wurde im Folgenden versucht, in der Mutante dTTP zu substituieren. Falls die Embryonen danach überleben, ist gezeigt, dass die Thymidylat-Synthese beeinträchtigt ist.

Die Substitution von dTTP oder Thymidin komplementiert nicht *cib-1(e2300)*

Wenn durch die Mutationen in dem Gen *cib-1* die Aktivität der Synthese herabgesetzt ist, fehlt den Zellen bei der Replikation dTTP. Eine Substitution von dTTP sollte dieses Problem umgehen, da das betroffene Enzym nicht mehr benötigt wird. In einem weiteren Experiment wurde das Nukleotid in verschiedenen Konzentrationen (100 µM/ml, 1 mM/ml und 10 mM/ml) im Überschuss in Hermaphroditen homozygot für *cib-1(e2300)* injiziert. Die Embryonen zeigten den typischen *cib-1*-Phänotyp, es konnte keine Veränderung festgestellt werden (Abbildung 2.10).

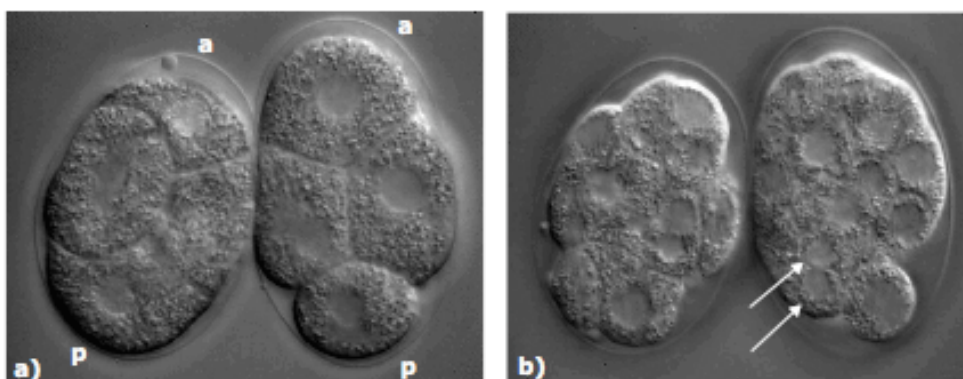


Abbildung 2.10: Zwei *cib-1(e2300)*-Embryonen 24 h nach der Injektion von dTTP in die Gonaden des Hermaphroditen. a) Die frühen Stadien entwickelten sich normal, b) im rechten Embryo teilte sich, wie für *cib*-Embryonen typisch, P3 symmetrisch in D und P4 (weiße Pfeile). Anterior (a) und posterior (p) sind in a) gekennzeichnet.

Theoretisch kann es neben der beschriebenen *de novo* Synthese von dTTP noch einen alternativen Syntheseweg für das Nukleotid geben. In Bakterien ist sowohl eine Wiederverwertung von Purin-Nukleotiden als auch ein Recycling für die Abbauprodukte der Nukleotide (*Salvage Pathway*, Berg, 2003) zu neuen Nukleotiden beschrieben worden. Ob es einen alternativen Syntheseweg gibt, wurde in einem ähnlichen Ansatz wie für dTTP mit Thymidin-Injektion untersucht. In den *cib-1(e2300)*-Embryonen konnte jedoch keine Veränderung des Phänotyps festgestellt werden. Dieses Experiment gibt also keinen Hinweis auf den alternativen Syntheseweg. Genau wie bei der Injektion von ddTTP oder dFU (siehe oben, S. 28 und S. 29) ist auch bei diesen Experimenten nicht klar, ob ein methodisches Problem vorliegt. Bisher ist die erfolgreichste Methode zum Einbringen verschiedener Substanzen in den frühen Embryo die hier benutzte Injektion (Fire *et al.*, 1998), die durchgeführten Experimente zeigten aber keinen Effekt auf die Embryonen.

Der alternative Syntheseweg für dTTP sollte statt durch Substitution auch mittels RNAi gezeigt werden. Ein Enzym, das evtl. an einer entsprechenden Reaktion beteiligt ist, ist die aus Bakterien bekannte Thymidinkinase. Sie kann sowohl an der alternativen Synthese als auch am Abbau von dTTP zu Thymidin beteiligt sein (Carlson *et al.*, 1985). Im Genom von *C. elegans* codiert nur das Gen Y43C5A.5 (*thk-1*, *thymidine kinase 1*) für eine Thymidinkinase. In RNAi-Experimenten von dem Gen wurde bisher kein letaler Phänotyp beschrieben (Kamath und Ahringer, 2003; Sonnichsen *et al.*, 2005). Um diese RNAi-Experimente zu überprüfen, wurde ein RNAi-Experiment in WT-Hermaphroditen durchgeführt. Nach Injektion von dsRNA konnte kein veränderter Phänotyp der Embryonen festgestellt werden. Da auch keine Mutanten für dieses Gen bekannt sind, kann die Beteiligung der Thymidinkinase an der dTTP-Synthese nicht bestätigt werden. Ein alternativer Syntheseweg für dTTP ist hier nicht nachweisbar.

Mutanten in der Synthese anderer Nukleotide haben andere Phänotypen

Die Mutationen in dem Gen *cib-1* verändern spezifisch die Synthese von dTTP. Die Inhibierung der Synthese jedes anderen Nukleotids hat wahrscheinlich ähnliche Auswirkungen auf die betroffenen Embryonen. Diese Hypothese lässt sich nach bisherigem Wissenstand nicht mit RNAi-Experimenten testen, da die Synthese von dTTP im Vergleich zu den übrigen dNTPs außergewöhnlich ist (siehe Kapitel 2.2, S. 20

und Berg, 2003). Die Nukleotide werden aus gemeinsamen Vorläufern neu synthetisiert oder im sog. *Salvage Pathway* wieder verwendet. Alle beteiligten Enzyme katalysieren universelle, nicht singuläre Reaktionen. Mutationen in universellen Enzymen verändern die Synthese von mehreren Nukleotiden und verursachen schwere Defekte in der Entwicklung von *C. elegans* (Brodigan *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 1998). Da es nicht möglich ist, spezifisch die Synthese eines einzelnen dNTP außer dTTP auszuschalten, wurden keine weiteren Experimente in dieser Richtung durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle drei singulären Enzyme der dTTP-Synthese in RNAi-Experimenten den gleichen Phänotyp verursachen wie Mutationen in dem Gen *cib-1*. Eine weitere Bestätigung für die Reduzierung der dTTP-Synthese war nicht möglich. Es sind allerdings Mutanten beschrieben worden, die ähnliche Defekte entwickelten. Die Literatur über diese Mutanten wird für das bessere Verständnis der nachfolgenden Experimente zusammengefasst dargestellt.

2.5 Die Mutante *cib-1(e2300)* ist mit *div-1(tl642ts)* vergleichbar

In einer Veröffentlichung von Encalada *et al.* (2000) wurde ein ähnlicher Phänotyp wie in der Mutante *cib-1(e2300)* beschrieben. Die Autoren nehmen jedoch keinen Bezug zu der Veröffentlichung über *cib-1* (Schnabel und Schnabel, 1990). Der Phänotyp wird durch eine Mutation in dem Gen *div-1* (*division delayed 1*) verursacht und zum besseren Verständnis im Folgenden vorgestellt. Die Mutanten in den beiden Genen werden miteinander verglichen. Sie sind einander auch auf molekularer Ebene sehr ähnlich.

Die Mutante *div-1(or148)* hat den gleichen Phänotyp wie *cib-1(e2300)*

In einer Mutantenlese für embryonal letale Mutanten wurden in dem Labor von Bruce Bowerman mehrere Mutanten mit vergleichbarem Phänotyp isoliert (Encalada *et al.*, 2000). In den letalen Embryonen teilten sich die Zellen der AB-Zelllinie etwas langsamer als im WT. Bei einem geringen Prozentsatz der Embryonen war die Teilung der P1-Zelle dagegen stark verzögert, die Interphase dauerte teilweise doppelt so lange wie in WT-Embryonen. Nach dieser Verzögerung teilte sich die Zelle symmetrisch in Bezug auf Größe und Schicksal der Tochterzellen. Die Zellen der EMS-Zelllinie entwickelten sich nicht zu Pharynxmuskel- und Darmzellen, sondern zu Hypodermiszellen. Der beobachtete Phänotyp wurde mit Mutanten in dem Gen *skn-1* verglichen, in

denen ähnliche Differenzierungsprobleme beobachtet wurden (siehe Kapitel 4.6, S. 141 und Bowerman *et al.*, 1992). Der Defekt in den Mutanten in dem Gen *skn-1* führt zu einer partiellen Transformation der EMS-Zelllinie in die posteriore P-Zelllinie, so dass mehr Hypodermiszellen entstehen. Stattdessen ist in der Mutante *div-1(or27)* nach einer symmetrischen Zellteilung eine Fehlverteilung des P-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktors PIE-1 (siehe Kapitel 2.15, S. 74 und Batchelder *et al.*, 1999; Tenenhaus *et al.*, 2001) zu sehen. Die beiden Mutanten *skn-1* und *div-1* sind also nicht direkt miteinander vergleichbar. In *div-1(or148)* werden die P-Granulae ebenfalls auf beide Tochterzellen aufgeteilt und in den nächsten Zellteilungen weiter segregiert. Das Gen *div-1* codiert für eine B-Untereinheit des DNA-Polymerase α -Primase Komplexes. Das Enzym ist essentiell für die Replikation. RNAi-Experimente mit weiteren Untereinheiten der DNA-Polymerase Primase zeigten Embryonen mit identischem Phänotyp.

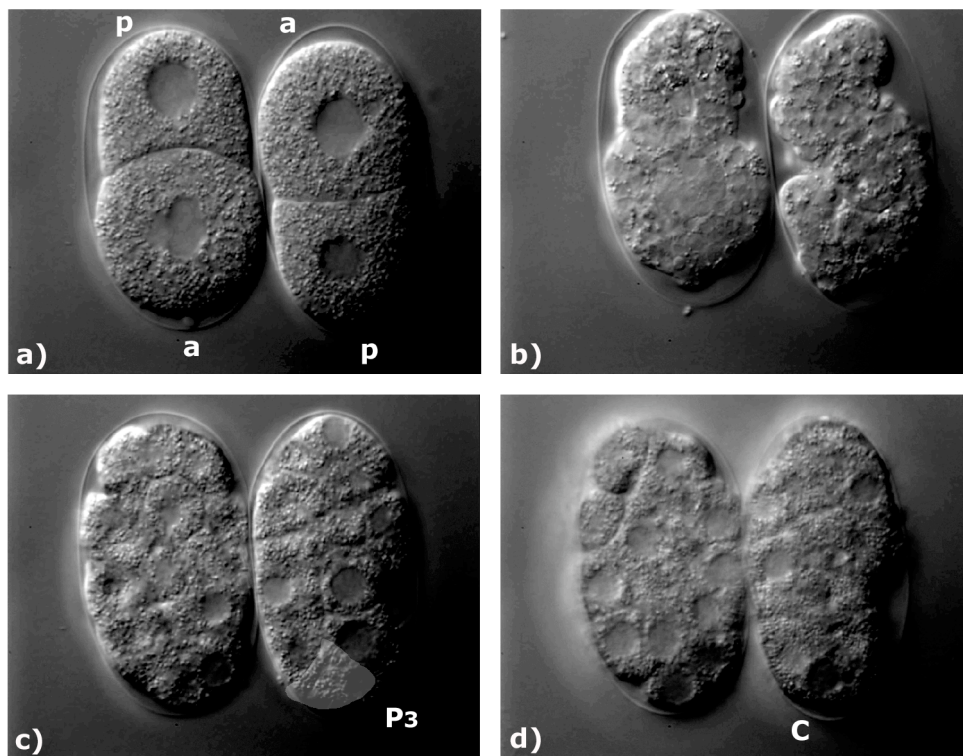


Abbildung 2.11: Zwei Embryonen der Mutante *div-1(or148ts)*. Im rechten Embryo teilte sich P2 symmetrisch. a) Das 2-Zell-Stadium wurde normal gebildet. b) Im terminalen Phänotyp sind die Zellen differenziert, das Darmcluster und der Pharynx sind zu erkennen. c) und d) Die P2-Zelle teilte sich symmetrisch, die Tochterzellen D und P3 sind gleich groß und liegen in verschiedenen Ebenen. In c) ist eine obere Ebene dargestellt, in d) eine untere zum gleichen Zeitpunkt. Die Lage der unteren Zelle ist in der oberen Ebene c) angedeutet.

Der beschriebene Phänotyp der Mutante *div-1(or27)* entspricht bis auf kleine Details wie der unterschiedlichen terminalen Zellzahl dem Phänotyp der Mutante *cib-1(e2300)*. Die typische symmetrische Teilung wurde in der P1-Zelle beobachtet. Zur Kontrolle des Phänotyps und um die Mutanten besser vergleichen zu können, wurden *div-1(or148ts)*-Embryonen am 4D-Mikroskop aufgenommen und analysiert. Die symmetrischen Teilungen traten auch in anderen Zellen der P-Zelllinie auf (siehe Abbildung 2.11). In einer weiteren Veröffentlichung wurde gezeigt, dass die verzögerten Zellen transient vor der Teilung am G2-Zellzyklus-Kontrollpunkt anhalten und dadurch die Verzögerung der Interphase entsteht (Brauchle *et al.*, 2003).

Die Mutante *div-1(tl642ts)* arretiert am G2-Zellzyklus-Kontrollpunkt

Es ist eine wichtige Frage, warum sich die P-Zellen in der Mutante *div-1(or148)* verzögert teilen. Die B-Untereinheit des DNA-Polymerase α -Primase Komplexes ist essentiell für die Replikation und der Zellzyklus der Zellen ist verzögert. Im Zellzyklus werden komplexe Prozesse wie die Replikation oder die Zellteilung an sog. Zellzyklus-Kontrollpunkten überprüft (Alberts, 1995). In der frühen Entwicklung von Embryonen verläuft der Zellzyklus sehr schnell. In Organismen, wie z.B. *Xenopus laevis* (*Xenopus*) oder *Drosophila*, werden die G1- und G2-Zellzyklus-Kontrollpunkte in der frühen Embryogenese nicht aktiviert (Dasso und Newport, 1990; Edgar und McGhee, 1988; Kimelman *et al.*, 1987; Raff und Glover, 1989). In der Arbeitsgruppe Gönczy wurde gezeigt (Brauchle *et al.*, 2003), dass in *C. elegans* in der Mutante *div-1(tl642ts)* in den frühen Stadien der G2-Zellzyklus-Kontrollpunkt aktiviert wird. Zum G2-Zellzyklus-Kontrollpunkt gehören die beiden Kinasen *atl-1* und *chk-1*. In anderen Organismen, wie *S. cerevisiae*, *S. pombe* oder Vertebraten, aktiviert ATL1 durch Phosphorylierung Chk1. Chk-1 phosphoryliert dann eine Phosphatase (Cdc25). Durch die Phosphorylierung wird Cdc25 deaktiviert und damit die Aktivität der Zellzyklus-Kinase Cdc2 abgesenkt. Dies führt z.B. bei unvollständiger oder fehlerhafter Replikation zu einem Arrest des Zellzyklus in der G2-Phase vor dem Beginn der Zellteilung.

Die beiden Komponenten des G2-Zellzyklus-Kontrollpunktes, *atl-1* und *chk-1*, sind von der Hefe bis zum Mensch konserviert und auch in *C. elegans* beschrieben worden (van den Heuvel, 2005). *atl-1* (*ATM like 1*) codiert für eine Phosphatidylinositol-3-Kinase, die zu der Familie der ATM-/ATR-Kinasen gehört (Abraham, 2001). In *C. elegans*

codiert das Gen *chk-1* (*checkpoint kinase 1*) für eine Serin-/Threonin-Kinase. Wenn eine der beiden Kinasen *atl-1* oder *chk-1* durch RNAi-Experimente (siehe Kapitel 4.4, S. 126) reduziert wird, können die Zellen nicht in der G2-Phase arretieren. Nach RNAi von *atl-1* oder *chk-1* in *div-1(t1642ts)* verzögern die AB- und die P1-Zelle im Zellzyklus kaum noch (Brauchle *et al.*, 2003). Nach RNAi von beiden Kinasen gleichzeitig in *div-1(t1642ts)* wird der Zellzyklus in der G2-Phase nicht angehalten. Die AB- und die P1-Zelle teilen sich innerhalb der gleichen Zeit wie in WT-Embryonen, wobei sich die AB-Zelle wie in WT immer vor der P1-Zelle teilte (siehe Abbildung 2.12, modifiziert aus Brauchle *et al.*, 2003). Da unvollständige Chromosomen während der Zellteilung nicht richtig segregiert wurden, zeigten Färbungen der DNA DNA-Brücken zwischen den Zellen.

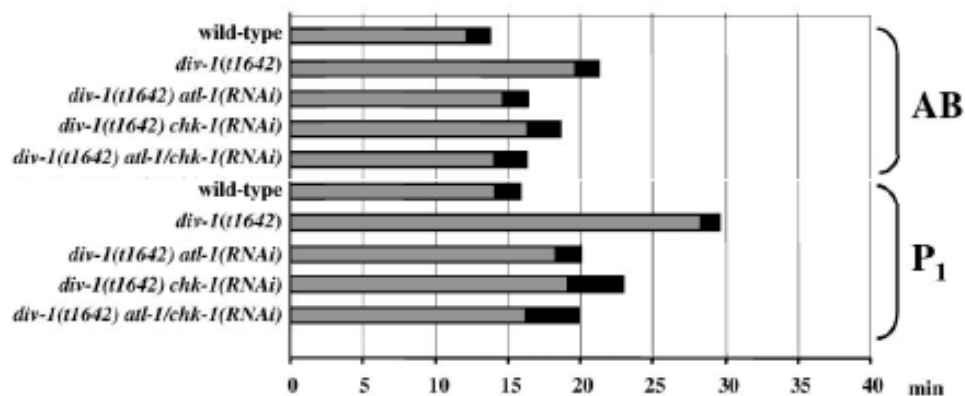


Abbildung 2.12: Vergleich der verschiedenen Teilungszeiten von AB und P1 in WT und *div-1(t1642)* allein und entweder mit *atl-1*-RNAi oder *chk-1*-RNAi oder *atl-1 chk-1*-RNAi. Die Teilungszeiten in der Mutante nähern sich mit RNAi den Teilungszeiten der WT-Embryonen. Abbildung modifiziert aus (Brauchle *et al.*, 2003).

In den RNAi-Embryonen wurde der Zellzyklus am G2-Zellzyklus-Kontrollpunkt nicht mehr angehalten. Da der Phänotyp der Mutante *div-1(t1642ts)* dem Phänotyp von *cib-1(e2300)* ähnlich sieht, wurden die RNAi-Experimente mit *atl-1* und *chk-1* zum Vergleich in der Mutante *cib-1(e2300)* wiederholt.

Zellen in *cib-1(e2300)* arretieren in der G2-Phase wie Zellen in *div-1(t1642ts)*

Mutationen in dem Gen *div-1* führen zu dem gleichen Phänotyp wie Mutationen in *cib-1*. Die Mutanten zeigen sowohl eine starke transiente Verzögerung des Zellzyklus in der P-Zelllinie als auch symmetrische Zellteilungen. Beide Genfunktionen sind eine Voraussetzung für die Replikation. Die Mutationen in dem Gen *cib-1* sollten genau wie

bei *div-1* zu einem Defekt bei der Replikation führen und die Zellen in der G2-Phase arretieren. Diese Hypothese wurde in der Mutante *cib-1(e2300)* mit einem RNAi-Experiment von beiden Kinasen *atl-1* und *chk-1* gleichzeitig überprüft. Homozygote Tiere wurden ab dem Larvenstadium L4 mit Bakterien gefüttert, die dsRNA von beiden Genen transkribieren (siehe Kapitel 4.4, S. 126 und 2.10, S. 55). Der Bakterienstamm wurde freundlicherweise von Pierre Gönczy (Brauchle *et al.*, 2003) zur Verfügung gestellt. Genau wie durch die Injektion von dsRNA kann durch Füttern ein RNAi-Effekt bei den Embryonen der F1-Generation ausgelöst werden (Fraser *et al.*, 2000). Die RNAi-Embryonen wurden am 4D-Mikroskop aufgenommen und ausgewertet.

Die Teilungszeiten der AB-Zelle und der P1-Zelle wurden gemessen und die Differenz gebildet (siehe Tabelle 2.1). Als Kontrolle dienten F1-Embryonen von WT-Hermaphroditen, die mit normalem Futter (*E. coli* OP50) gefüttert wurden. Als Kontrolle für die spezifische Wirkung der dsRNA diente ein Kontrollvektor mit *cwn-2* in den gleichen Bakterien wie der Vektor mit *atl-1* und *chk-1*. CWN-2 ist ein Rezeptor des Wnt-Signalwegs (Shackleford *et al.*, 1993) und verursacht keinen RNAi-Effekt auf Embryonen, erst die Hermaphroditen der F1-Generation werden steril. Bei WT-Embryonen teilte sich die P1-Zelle 2,0 min. nach der AB-Zelle (n = 7). Durch *atl-1 chk-1*-RNAi wurden die Zellteilungen der WT-Embryonen unwesentlich beschleunigt. In den Mutanten teilte sich bei normalem Futter die P1-Zelle 6,0 min. später als die AB-Zelle (n = 15). Der Kontrollansatz mit *cwn-2* verursachte keine Veränderung. Erst der RNAi von *atl-1 chk-1* beschleunigte die Zellteilung, der Zeitunterschied war mit 2,1 min. ähnlich wie bei WT-Embryonen.

| Genotyp der Embryonen | Futter | n | P1 nach AB (min.) |
|-----------------------|--------------------|----|-------------------|
| WT | OP50 | 7 | 2,0 |
| <i>cib-1(e2300)</i> | OP50 | 15 | 6,0 |
| <i>cib-1(e2300)</i> | <i>cwn-2</i> | 7 | 5,6 |
| <i>cib-1(e2300)</i> | <i>atl-1 chk-1</i> | 10 | 2,1 |

Tabelle 2.1: Vergleich der Differenz der Teilungszeiten von AB und P1 in WT- bzw. *cib-1(e2300)*-Embryonen mit und ohne RNAi. Mit *atl-1 chk-1*-RNAi teilen sich die Zellen in *cib-1(e2300)*-Embryonen fast mit demselben Zeitunterschied wie in WT-Embryonen.

Die Verzögerung im Zellzyklus hängt auch bei *cib-1(e2300)*-Embryonen wie in *div-1(tl642ts)* davon ab, dass in den Zellen der G2-Zellzyklus-Kontrollpunkt aktiviert wird. In den Embryonen wird wahrscheinlich noch dTTP gebildet, aber entweder ist die Menge insgesamt nicht ausreichend oder das Nukleotid wird zu langsam hergestellt, um

die Replikation in der notwendigen Geschwindigkeit zu ermöglichen. Die Mutationen müssen direkte Auswirkungen auf die Replikation haben, daher wurde im nächsten Experiment die Replikation in der Mutante *cib-1(e2300)* betrachtet.

2.6 In *cib-1(e2300)* wird die DNA-Integrität mit *atl-1 chk-1* kontrolliert

Die Synthese von dTTP ist in den Mutanten *cib-1(e2300)* und *cib-1(e2303)* wahrscheinlich herabgesetzt, die Zellen halten an dem G2-Zellzyklus-Kontrollpunkt an. Bisher ist ein direkter Defekt bei der Replikation aber nicht nachgewiesen worden. Eine Veränderung der Replikation muss auch Auswirkungen auf die Menge an DNA oder die Integrität der DNA in den Zellen haben. Diese Hypothese wurde mit verschiedenen Experimenten getestet.

Die Menge und Integrität der DNA ist in *cib-1*-Embryonen normal

In der Veröffentlichung über *cib-1* (Schnabel und Schnabel, 1990) wurde die Menge der DNA in verschiedenen Zellen der Embryonen und zu verschiedenen Zeiten des Zellzyklus gemessen. Die DNA wurde mit Hoechst 33258 angefärbt und die Fluoreszenz am Mikrophotometer quantifiziert. Als Vergleich dienten Metaphaseplatten der P0-Zelle (als haploide Zelle) und die DNA-Menge von AB-Zellen direkt nach der Zellteilung (als diploide Zelle). Nach der Verzögerung oder Pause in der G1-Phase des Zellzyklus in der Mutante waren P1-Zellen immer noch diploid, der Zellzyklus hielt vor der Replikation an. Vor der nächsten Zellteilung war die Replikation abgeschlossen und die P1-Zelle wie in WT-Embryonen tetraploid.

Durch Färbungen der DNA mit Hoechst 33258 sind keine Fehler bei der Replikation in der Mutante *cib-1(e2300)* feststellbar. Da es aber nach dem bisherigen Wissen diese Fehler geben muss, wurde für diese Arbeit die DNA mit DAPI angefärbt (siehe Material und Methoden 4.4, S. 124). Die gefärbten Embryonen wurden am konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LSM) ausgewertet. Am LSM wurde eine Software zur Auswertung benutzt, die den direkten Intensitätsvergleich von kreisförmigen Bereichen ermöglicht (siehe Material und Methoden, Kapitel 4.4, S. 126). Zu allen untersuchten Zeitpunkten vor und nach den Zellteilungen wurde kein Unterschied zwischen mutanten Embryonen und WT-Embryonen festgestellt.

Es konnte keine Veränderung der DNA-Integrität gemessen werden. Die Replikation muss in der Mutante in viel kleinerem Maßstab verändert sein, so dass sich mit der Färbung keine Lücken oder Doppelstrangbrüche in der DNA finden lassen. Um die DNA-Integrität zu untersuchen, wurde ein *C. elegans*-Stamm mit *cib-1(e2300)* und einem Histon::GFP-Konstrukt konstruiert. Die DNA-Integrität wurde in diesem Stamm zuerst mit und danach ohne Zellzyklus-Kontrolle untersucht.

Auch mit Histon::GFP wird keine Veränderung der DNA-Integrität beobachtet

Für diesen Versuch wurde ein Expressionsvektor für ein Histon::GFP-Fusionsprotein eingesetzt. Der Vektor trägt das Gen für das Histon H2B unter der Kontrolle des endogenen Promotors. Mit der cDNA des Histons wurde die Sequenz von GFP (*green fluorescent protein*) fusioniert. Das Fusionsprotein lokalisiert in *C. elegans*-Embryonen mit genetischem WT-Hintergrund in den Zellkernen an der DNA (Kaitna *et al.*, 2000). Ein homozygoter *cib-1(e2300)*-Stamm mit dem Histon::GFP-Konstrukt als stabiles Array wurde hergestellt (siehe Kapitel 4.4, S. 121) und die Embryonen bei restriktiver Temperatur aufgenommen. In der Mutante ist die Fluoreszenz wie in WT-Embryonen überall im Zellkern zu sehen. Vor der Teilung der AB-Zellen sind im 4-Zell-Stadium die kondensierten Chromosomen zu erkennen. In späteren Stadien wurden manchmal DNA-Fragmente außerhalb des Zellkerns beobachtet.

Diese DNA-Fragmente befanden sich im Cytoplasma und unterschieden sich deutlich von anderen Strukturen wie z.B. den Polkörperchen (siehe Abbildung 2.13). Wenn es zur Separation von DNA-Fragmenten kommt, sind in einem *cib-1(e2300)*-Embryo aber die symmetrischen Teilungen schon vorbei. Ein sichtbarer Unterschied in der DNA-Verteilung wurde also erst nach dem Auftreten des *cib*-Phänotyps beobachtet.

Auch in diesem Experiment konnte keine Veränderung der DNA-Integrität in den frühen Stadien der Embryonalentwicklung beobachtet werden.

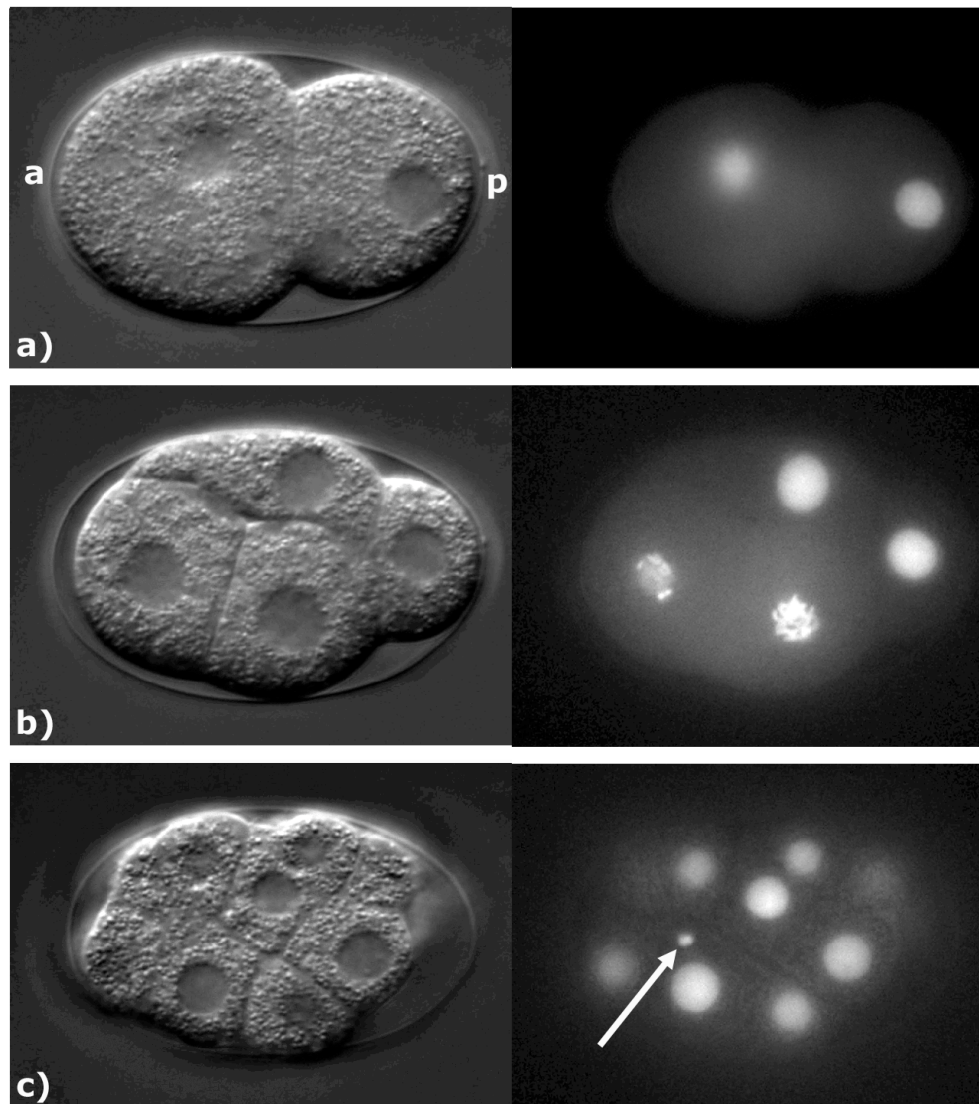


Abbildung 2.13: Ein homozygoter *cib-1(e2300)*-Embryo mit dem Histon::GFP-Konstrukt zeigte auch bei restriktiver Temperatur ein normales Expressionsmuster im 2- und 4-Zell-Stadium. Erst danach ist in einer Zelle ein DNA-Fragment außerhalb des Zellkerns zu sehen (weißer Pfeil). Links ist jeweils das Entwicklungsstadium des Embryos bei Nomarski-Optik zu sehen, rechts die Fluoreszenzaufnahme desselben Stadiums. Die Zellkerne fluoreszierten gleich stark, lagen aber in verschiedenen Ebenen. a) 2-Zell-Stadium. b) 4-Zell-Stadium. c) 12-Zell-Stadium, die anderen Zellen liegen in anderen Ebenen. Anterior (a) und posterior (p) sind in a) gekennzeichnet.

DNA-Integrität hängt von der Zellzyklus-Kontrolle ab

Wie zuvor gezeigt, hält die P1-Zelle in *cib-1(e2300)*-Embryonen an dem Zellzyklus-Kontrollpunkt an, der durch *atl-1* und *chk-1* reguliert wird. Wenn bei der Replikation in der Mutante Fehler auftreten, wird der Zellzyklus angehalten und die DNA repariert. Aus diesem Grund sind in *cib-1(e2300)*-Embryonen mit H2B::GFP keine Defekte in der DNA zu erkennen.

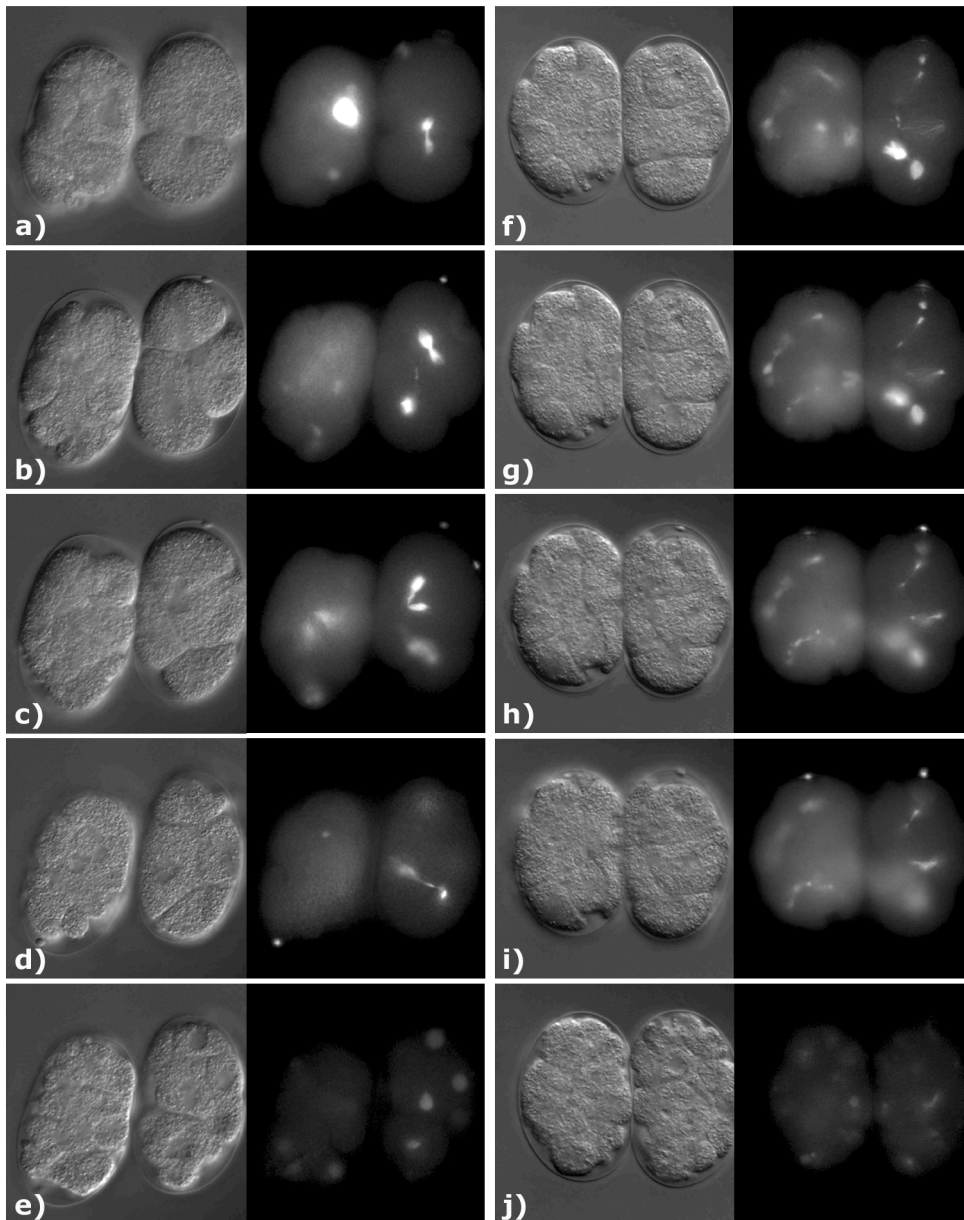


Abbildung 2.14: *cib-1(e2300)*-Embryonen mit Histon::GFP und *atl-1 chk-1*-RNAi, die Chromosomen wurden nicht korrekt segregiert. Links ist jeweils die Ansicht der Embryonen bei Nomarski-Optik gezeigt, rechts die Ansicht im Fluoreszenzkanal. a) – e) Zwei Embryonen, die ab der ersten Zellteilung starke Teilungsprobleme hatten. Bei der Expression von Histon::GFP wurde deutlich, dass sich die DNA in langen Brücken zwischen den Zellen hinzog und nicht korrekt segregiert wurde. Über die Zeit nahm die Intensität der Fluoreszenz stark ab. f) – j) Zwei weitere Embryonen mit Teilungsproblemen. Hier sind vier verschiedene Ebenen der Embryonen an einem Zeitpunkt dargestellt (f – i). In der Fluoreszenzansicht der Embryonen ist sichtbar, dass die Chromosomen von einem Zellkern durch die Ebenen zum nächsten reichten und die DNA aller Zellen miteinander verbunden war. In j) ist der terminale Phänotyp der beiden Embryonen zu sehen, auch hier nahm die DNA-Menge pro Zellkern durch die Teilungen ohne Replikation stark ab.

Da sich die Zellen in der Mutante nach RNAi-Experimenten von *atl-1 chk-1* wieder deutlich schneller teilen (siehe Kapitel 2.5, Tabelle 2.1, S. 36), ist in diesen Zellen die

Replikation wahrscheinlich nicht vollständig. Um nach der Inaktivierung des Kontrollpunktes DNA-Schäden zu erkennen, wurden die RNAi-Fütterungsexperimente (siehe Kapitel 4.4, S. 126) mit den beiden Zellzyklus-Kinasen *atl-1* und *chk-1* in der Mutante *cib-1(e2300)* mit dem H2B::GFP wiederholt.

Für den Versuch wurden L4-Larven von diesem Stamm bei restriktiver Temperatur mit *atl-1 chk-1*-RNAi-Bakterien gefüttert (siehe Kapitel 2.5, S. 24). Die Embryonen der F1-Generation wurden am 2-Kanal-4D-Mikroskop ausgewertet. Schon ab der ersten Zellteilung wurden die Chromosomen nicht mehr normal segregiert, es entstanden Chromosomenbrücken zwischen den Zellen. Je weiter sich die Embryonen entwickelten, desto mehr Probleme bei der Replikation traten auf, und die DNA-Menge und die DNA-Integrität nahmen während der folgenden Zellteilungen immer mehr ab (siehe Abbildung 2.14). Die Mutation in *cib-1(e2300)* verursacht tatsächlich Probleme bei der Replikation. Dieser Defekt ist in den Embryonen ohne *atl-1 chk-1*-RNAi jedoch so gering, dass in der DNA noch keine sichtbaren Lücken entstehen.

Die Zellen der Mutante *cib1(e2300)* halten am G2-Zellzyklus-Kontrollpunkt an. Eine Folge der Verzögerung vor der Zellteilung ist die Veränderung des Zellschicksals in der P1-Zelle. Es bleibt offen, wie das Zellschicksal mit der DNA-Integrität verknüpft ist. Eine weitere Frage ergibt sich durch die spezifische temperatursensitive Phase der Mutanten. Offenbar haben die Mutationen in *cib-1* keine Auswirkungen auf die Überlebensfähigkeit der Embryonen in der späten Embryonalentwicklung. Dieses paradoxe Verhalten wird im nächsten Kapitel durch den Vergleich mit WT-Embryonen erklärt.

2.7 Während der gesamten Embryogenese wird Zellzyklus kontrolliert

Die temperatursensitive Phase der Mutante *cib-1(e2300)* ist sehr spezifisch für die frühe Embryogenese (siehe Kapitel 1.3, S. 10). Warum kann sich die Mutante überhaupt mit einer zu langsamen Syntheserate von dTTP normal entwickeln? Zu keinem Zeitpunkt wurde eine Verzögerung der Larvalentwicklung beobachtet. Auch die Keimbahnproliferation in den Gonaden verlief genau wie in WT-Hermaphroditen, die Gelegegröße war gleich. Die Mutation führt nur zu Defekten während der frühen Embryogenese. Eine Erklärung kann sein, dass die verschiedenen Larvenstadien und die adulten Würmer

dTTP aus der Nahrung aufnehmen. Diese Möglichkeit erklärt aber nicht, warum die Entwicklung der Embryonen etwa ab der Morphogenese im Ei unabhängig von der Synthese von dTTP ist, und warum die meisten Embryonen ab dem 200-Zell-Stadium auch bei restriktiver Temperatur überleben. Wenn das Enzym CIB-1 in den Mutanten nur eingeschränkt funktioniert, sollten sich die späteren Embryonalstadien zu langsam entwickeln, da auch dann die Zellen an dem Zellzyklus-Kontrollpunkt anhalten.

Die Embryonen können dTTP nicht von außen durch die Eihülle aufnehmen. Einerseits muss nach der externen dTTP-Aufnahme die Entwicklung auch im frühen Embryo ungestört ablaufen, andererseits existiert während einer Entwicklung unter dem Mikroskop in Wasser keine dTTP-Quelle. Um die Entwicklungsgeschwindigkeit der späteren Embryonalstadien direkt mit WT-Embryonen zu vergleichen, wurden je ein WT-Embryo und ein *cib-1(e2300)*-Embryo ab kurz nach der Befruchtung zusammen unter dem 4D-Mikroskop bei permissiver Temperatur aufgenommen. Die beiden Embryonen entwickelten sich genau gleich schnell (siehe Abbildung 2.15). Für das Experiment wurden die beiden Embryonen zuerst bei der permissiven Temperatur bis zur 9. Zellgeneration inkubiert und danach für die weitere Entwicklung auf die restriktive Temperatur transferiert. Der Temperaturwechsel dauerte etwa 6 min., also kürzer als eine Zellteilungsrunde in dem betreffenden Stadium. Bis zu dieser Temperaturänderung entwickelten sich beide Embryonen absolut gleich schnell, danach führte die Änderung in den mutanten Embryonen sofort zu einer Verlangsamung der Entwicklung (siehe Abbildung 2.15d bis e). Dieses Experiment wurde mit Temperaturänderungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung wiederholt. Die Verlangsamung nahm mit der Inkubationszeit bei der restriktiven Temperatur zu. Im Vergleich zu dem Teilungsmuster des WT-Embryos teilten sich die Zellen des *cib-1*-Embryos deutlich zu langsam. Die mutanten Embryonen zeigten also auch in der späten Embryonalentwicklung deutliche Defekte, die jedoch nicht letal waren. Die späte Embryonalentwicklung ist genauso wie die frühe abhängig von der dTTP-Synthese und der Replikation. Die frühe Letalität der Mutante deutet an, dass nur während der frühen Embryogenese der pünktliche Ablauf der Zellzyklus-Uhr (*developmental clock*) sehr wichtig ist, in der späteren Entwicklung aber nicht mehr. Ob das auch mit den speziellen Anforderungen an die Teilungen der P-Zelllinie zusammenhängt, bleibt offen.

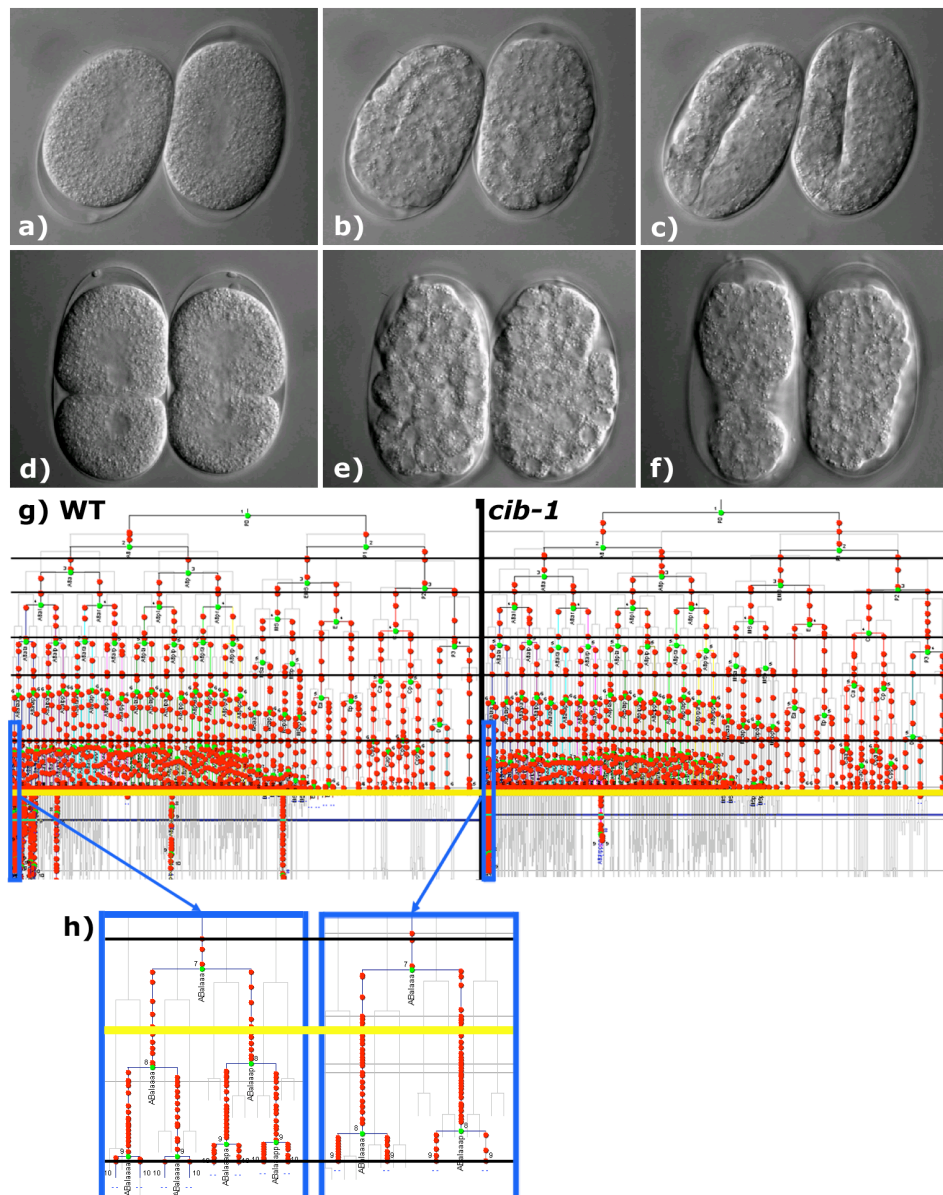


Abbildung 2.15: Auch in der späten Embryonalentwicklung verursacht die Mutation *cib-1(e2300)* eine Verlangsamung der Embryogenese, aber die Embryonen sterben nicht daran. a) – c) In der Kontrolle entwickelten sich ein WT-Embryo (links) und ein *cib-1(e2300)*-Embryo (rechts) bei der permissiven Temperatur genau gleich schnell. a) Während der Pronukleiverschmelzung in den Zygoten waren die Embryonen gleich alt. b) Prämorphogenetische Stadien. c) 2-fach-Stadien. d) – f) Wieder wurden ein WT-Embryo (links) und ein *cib-1(e2300)*-Embryo (rechts) zusammen aufgenommen, der WT-Embryo war 1 min. älter. Bis zur Temperaturänderung von permissiver auf restriktive Temperatur blieb der Unterschied gleich, danach entwickelt sich der mutante Embryo wesentlich langsamer als der andere. d) Die beiden Embryonen während der ersten Zellteilung. e) Vor der Temperaturänderung waren beide Embryonen beinahe gleich alt, f) Der WT-Embryo erreichte schon das Komma-Stadium, der mutante Embryo war erst im prämorphogenetischen Stadium. Anterior (a) und posterior sind in a) und d) gekennzeichnet. g) Lineage des WT-Embryo im Vergleich zur Lineage des *cib-1(e2300)*-Embryo, die Zellteilungen bis zur Temperaturänderung (gelbe Linie) sind gleich schnell. Zum besseren Vergleich wurde pro Zellgeneration ein Zeitpunkt markiert (schwarze Linien). h) Nach dem Temperaturwechsel ist der mutante Embryo deutlich langsamer, was in der Vergrößerung des Lineageausschnitts gut zu erkennen ist. Beide Embryonen schlüpfen.

cib-3

Außer den Mutanten *cib-1(e2300)* und *cib-1(e2303)* zeigt auch eine andere Mutante aus der Stammsammlung des Labors den interessanten *cib*-Phänotyp (siehe Kapitel 1.3, S. 10). Die Mutante *cib-3(e2280)* wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert und die Funktion des Gens während der Embryonalentwicklung von *C. elegans* charakterisiert.

2.8 *cib-3(e2280)* hat den typischen *cib*-Phänotyp

Das Allel *cib-3(e2280)* stammt ebenfalls aus der Sammlung von temperatursensitiven (ts) maternal letalen Mutanten aus Cambridge und wurde ursprünglich in einer Diplomarbeit (Feichtinger, 1990) untersucht. Zum besseren Verständnis der weiteren Arbeiten mit der Mutante *cib-3(e2280)* werden die Ergebnisse aus der Diplomarbeit hier zusammengefaßt.

***cib-3(e2280)* wurde zuerst durch Richard Feichtinger (1990) charakterisiert**

Die Mutante *cib-3(e2280)* zeigt neben einer allgemein verlangsamten Entwicklung der Embryonen zusätzliche Abweichungen gegenüber WT-Embryonen im Zellteilungsmuster der EMS-Zelllinie (siehe auch Abbildung Abbildung 1.1, S. 8). Die Reihenfolge der Zellteilungen von MS- und E-Zellen und von deren Tochterzellen ist bei 40 % der Embryonen verändert oder vertauscht. Der Zusammenhang zwischen Teilungszeitpunkt und Zelllinie ist nicht mehr gegeben, so dass z.B. das E-Zellschicksal an jeder beliebigen Stelle der EMS-Zelllinie auftreten kann. Dieser spezifische Phänotyp in der E-Zelllinie war sehr interessant, und die Mutante *cib-3(e2280)* wurde deshalb von Richard Feichtinger weiter charakterisiert und kartiert (siehe Kapitel 2.9, S. 48). Die ts-Phase der Mutante liegt vor dem 64-Zell-Stadium, das Protein wird daher sehr früh in der Embryonalentwicklung essentiell benötigt. Die Embryonen sterben mit 180 bis 400 Zellen terminal später als die *cib-1*-Embryonen, die Zellen lassen ab dem 50-Zell-Stadium Teilungsrunden aus, sie teilen sich sehr spät oder auch gar nicht mehr.

Bei der weiteren Charakterisierung der Mutante beobachtete Richard Feichtinger außer dem veränderten Teilungsmuster in der EMS-Zelllinie auch Defekte in der P-Zelllinie. Der *cib*-Phänotyp der Embryonen ist sehr variabel, in 30 % der Embryonen teilen sich P2- oder P3-Zellen symmetrisch. Die Mutante *cib-3(e2280)* wurde daher in die Klasse der *cib*-Mutanten eingeordnet. Bei einer symmetrischen Zellteilung werden die

P-Granulae (Strome und Wood, 1983) nicht in die nächste P-Zelle, sondern gleichmäßig in beide Tochterzellen segregiert. Die Tochterzellen teilen sich stark verzögert oder auch gar nicht mehr. Die stark verzögerten Zellteilungen erfolgen meist gleichzeitig in beiden Tochterzellen, so dass ein synchrones Zellteilungsmuster entsteht. In den terminalen Embryonen ist die Zahl der morphologisch differenzierten Zellen sehr verschieden, die Darmgranulae und beobachtete Muskelbewegungen sind gegenüber WT-Embryonen verändert.

Die Mutante *cib-3(e2280)* verhält sich nicht immer rezessiv. Bei heterozygoten Hermaphroditen stirbt je nach verwendetem Stamm und Individuum bei restriktiver Temperatur ein Teil der Embryonen, die richtige Dosierung des Gens ist sehr wichtig. Durch häufiges Kreuzen mit dem WT-Stamm wird dieser Dominanzeffekt (Semidominanz) verstärkt und nimmt dann über mehrere Generationen wieder ab. Ob diese kurzfristigen Veränderungen des Phänotyps genetische Ursachen haben oder epigenetisch reguliert werden, ist bisher nicht geklärt. Das Allel *cib-3(e2280)* hat auf jeden Fall eine Restfunktion.

Da rezessive Allele zuverlässigere Ergebnisse bei der Untersuchung der Mutanten liefern, wurden weitere Allele des Gens *cib-3* gesucht (Feichtinger, 1990). Außer Reversionsexperimenten wurden auch die Mutagenese von WT-Männchen mit anschließendem Nichtkomplementationstest und die Mutagenese eines Balanzerstamms mit dem Balanzer *szT1* durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente werden später noch beschrieben (siehe Kapitel 2.9, S. 48).

Das Genprodukt von *cib-3* wird in der P2- und in der P3-Zelle benötigt, die Mutante *cib-3(e2280)* ist der Mutante *cib-1(e2300)* sehr ähnlich. Allerdings nehmen die P-Zellen nach einer symmetrischen Teilung nicht unbedingt das unterliegende somatische Schicksal an, sondern es kommt eher zu einem Identitätsverlust. Die veränderte EMS-Zelllinie in der Mutante kann entweder durch eine direkte oder durch eine indirekte Funktion des Gens *cib-3* ausgelöst sein, da die Spezifizierung der EMS-Zelllinie und das Zellteilungsmuster von der intakten P2-Zelle abhängt (siehe Kapitel 1.3, S. 10).

Da das mutierte Gen *cib-3* offensichtlich eine Funktion in der P-Zelllinie hat, wurde die Mutante im Rahmen dieser Arbeit phänotypisch weiter charakterisiert und das Gen kloniert.

Der Phänotyp von *cib-3(e2280)* wird bestätigt

Zu Beginn dieser Arbeit wurde der Phänotyp der Mutante *cib-3(e2280)* nach der Kryokonservierung überprüft und mit den Ergebnissen aus der Diplomarbeit verglichen (Feichtinger, 1990). Der beschriebene Phänotyp war unverändert und es wurden mit Hilfe der 4D-Mikroskopie (Schnabel *et al.*, 1997) weitere Defekte in den Embryonen beobachtet. Embryonen des Allels *cib-3(e2280)* entwickelten 70 – 250 Zellen terminal (siehe Abbildung 2.16). Bei 25 % der Embryonen teilten sich P3-Zellen symmetrisch, die Tochterzellen teilten sich nicht weiter. Die anderen 75 % der Embryonen zeigten erst später andere Defekte, wie z.B. ein langsames Zellteilungsmusters in der EMS-Zelllinie. Symmetrische Teilungen in der P2-Zelle wie in *cib-1(e2300)*-Embryonen wurden nicht beobachtet. Das Zellteilungsmuster der mutanten Embryonen war ab dem 24-Zell-Stadium auch in der AB-Zelllinie verändert, die Abfolge der Zellteilungen erfolgte asynchron. Über das Schicksal der AB-Zellen wurde keine Aussage gemacht, da diese nicht differenzierten und keine morphologischen Unterscheidungsmerkmale während der Spezifizierung bekannt sind. Weitere Unterscheidungsmöglichkeiten sind auf molekularer Ebene zu suchen, sie werden später noch beschrieben (siehe Kapitel 2.15, S. 74).

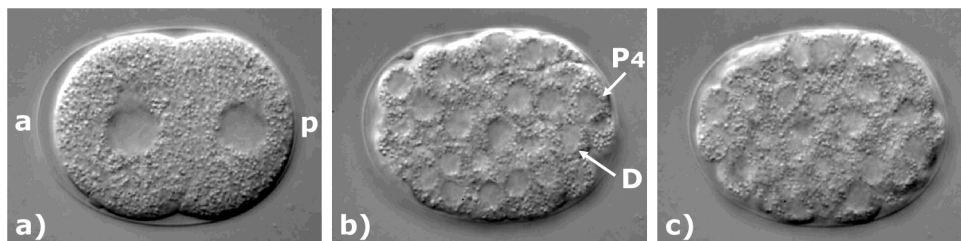


Abbildung 2.16: Aufnahme eines Embryos mit dem Allel *cib-3(e2280)*. a) Das 2-Zell-Stadium wurde normal gebildet. Anterior (a) und posterior (p) sind gekennzeichnet. b) Symmetrische Teilung der P3-Zelle, die Tochterzellen D und P waren gleich groß und lagen in einer Ebene. c) Terminaler Phänotyp mit verschiedenen großen Zellen.

Die Defekte der Embryonen in der EMS- und in der P-Zelllinie veranlassten Richard Feichtinger zu der Annahme, dass das Gen *cib-3* ab dem 4-Zell-Stadium eine Funktion bei der Entwicklung der beiden Zelllinien hat. Die Verlangsamung der EMS-Zelllinie kann direkt durch die Mutation oder sekundär durch eine Veränderung der P2-Zelle ausgelöst sein. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Defekten zeigte die Mutante *cib-3(e2280)* auch asynchrone Zellteilungen in der AB-Zelllinie. Dieser neue Aspekt des

Phänotyps erweitert den Zeitraum der Embryonalentwicklung, in dem das Gen *cib-3* eine Funktion übernimmt. Ob diese Funktion von *cib-3* direkt zu der Spezifizierung der AB-Zelllinie beiträgt oder indirekt über die Induktion der AB-Zelle durch die P1-Zelle (Hutter und Schnabel, 1995b), muss geklärt werden. Bisher gibt es keine Hinweise auf eine Funktion von *cib-3* in der Zygote. Nach Kreuzungen zur Kartierung des Gens fiel aber ein weiterer Defekt in der Entwicklung der Mutante *cib-3(e2280)* auf, der eine Funktion des Gens vor der Befruchtung andeutet.

Es gibt zusätzliche Defekte in der Gonadenentwicklung

Neben der embryonalen Letalität verursacht die Mutation *cib-3(e2280)* auch Defekte in der weiteren Entwicklung. Diese Defekte war verstärkt nach Kreuzungen mit *dpy-5(e61)* zur Kartierung der Mutante *cib-3(e2280)* aufgefallen. *dpy-5* codiert für ein Cuticula-Collagen, die Mutante *dpy-5(e61)* ist ab dem L3-Stadium kurz und dick. Die Doppelmutante *cib-3(e2280) dpy-5(e61)* wuchs bei permissiver Temperatur nur sehr langsam, da die Hermaphroditen in zehn Tagen nur ca. 50 Eier legten. Von diesen 50 Eiern starben über 50 % während der Embryonalentwicklung auch bei permissiver Temperatur. Bei restriktiver Temperatur legten die Hermaphroditen nur noch 2 – 8 tote Eier, manche waren sogar steril. Die nähere Untersuchung dieser geringen Fertilität zeigte, dass die Gonaden der Hermaphroditen in anderer Form verliefen als in WT-Hermaphroditen (siehe Abbildung 2.17). Als Kontrolle diente der U-förmige Verlauf der Gonaden in WT-Hermaphroditen und in *dpy-5(e61)*-Hermaphroditen. Die Gonaden in der Mutante *dpy-5(e61)* waren verkürzt und weniger Eier wurden abgelegt (bis zu 120), die Gonaden waren aber normal geformt.

Die Defekte in den Doppelmutanten *cib-3(e2280) dpy-5(e61)* waren sehr vielfältig. Manchmal verliefen die Gonadenarme anders durch den Hermaphroditen, in anderen Fällen fehlten bestimmte Bereiche oder die Gonaden endeten blind. Spermatheka waren ebenfalls missgebildet oder fehlten. Die Entwicklung der Gonaden ist in homozygoten Tieren verändert, das Gen *cib-3* hat daher auch eine zygotische Funktion. Das Genprodukt wird zusätzlich an einem anderen Zeitpunkt der Entwicklung benötigt als bisher angenommen.

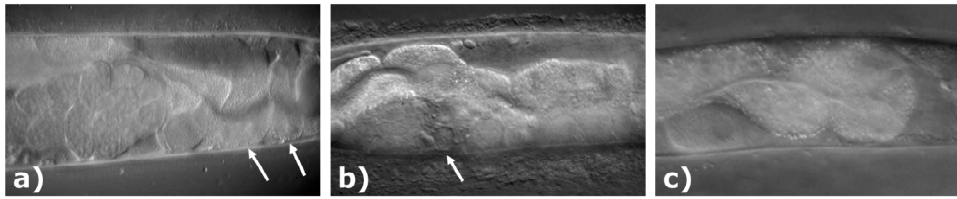


Abbildung 2.17: Der Verlauf der Gonaden war in der Doppelmutante *cib-3(e2280) dpy-5(e61)* verändert. Die Gonadenarme verliefen in Schleifen (a, Pfeile) und die Spermatheka waren verändert (b, Pfeil). c) In der Kontrolle *dpy-5(e61)* verliefen die Gonaden U-förmig wie in WT-Hermaphroditen.

Die Mutante *cib-3(e2280)* zeigt neben dem interessanten Phänotyp in der EMS-Zelllinie auch Defekte in der P-Zelllinie und in der Gonadenentwicklung. Die Funktion des Gens hängt offenbar unmittelbar mit der Entwicklung der Keimbahn zusammen. Um die Genfunktion genauer untersuchen zu können, wurde das Gen im Rahmen dieser Arbeit kloniert.

2.9 Klonierung des Gens *cib-3* im Rahmen dieser Arbeit

Um den interessanten Phänotyp der Mutante und den Effekt der Mutation auf die Genfunktion genauer zu untersuchen, wurde das Gen *cib-3* kloniert. Als Grundlage wurden Daten aus Kartierungen von Ralf Schnabel und Richard Feichtinger (1990) verwendet.

Erste Kartierung der Mutante *cib-3(e2280)* durch Richard Feichtinger

Bereits 1989 wurde die Mutante *cib-3(e2280)* mit klassisch genetischen Kreuzungen kartiert. Ralf Schnabel konnte das Gen *cib-3* auf dem Chromosom I zwischen *bli-3(e767)* und *unc-73(e936)* bzw. *unc-13(e450)* lokalisieren. Richard Feichtinger grenzte den in Frage kommenden Bereich mit einer 2-Faktor- und einer 3-Faktor-Kreuzung weiter ein. Nach diesen Ergebnissen liegt *cib-3(e2280)* zwischen *dpy-5(e61)* und *egl-30(n686)*. Die Auswertung der Rekombinanten positioniert *cib-3(e2280)* in Relation zu beiden phänotypischen Markern etwa 24 % der Gesamtdistanz von *dpy-5(e61)* entfernt (siehe nächste Seite, Abbildung 2.18).

Weiterführende Kartierung der Mutante *cib-3(e2280)*

Für die weitere Kartierung von *cib-3* wurden für diese Arbeit die Daten aus den bisherigen Kartierungen von der genetischen auf die physikalische Karte übertragen (siehe Abbildung 2.18). *egl-30(n715)* liegt auf dem linken Arm von Chromosom I bei

-12,580 \pm 0,160 cM und *dpy-5(e61)* bei 0,000 \pm 0,003 cM auf der genetischen Karte des *C. elegans* Genoms (<http://www.wormbase.org>). Beide Gene sind kloniert, die Sequenz des *C. elegans* Genoms ist ebenfalls bekannt (Babity, 1988; Brundage *et al.*, 1996). Um den Bereich weiter einzugrenzen, in dem die Mutation *cib-3(e2280)* liegt, wurde eine SNP-Kartierung durchgeführt (siehe Kapitel 0, S. 131). Nach dieser Kartierung liegt das Gen *cib-3* auf jeden Fall näher am Chromosomenende (links) als SNP 2.

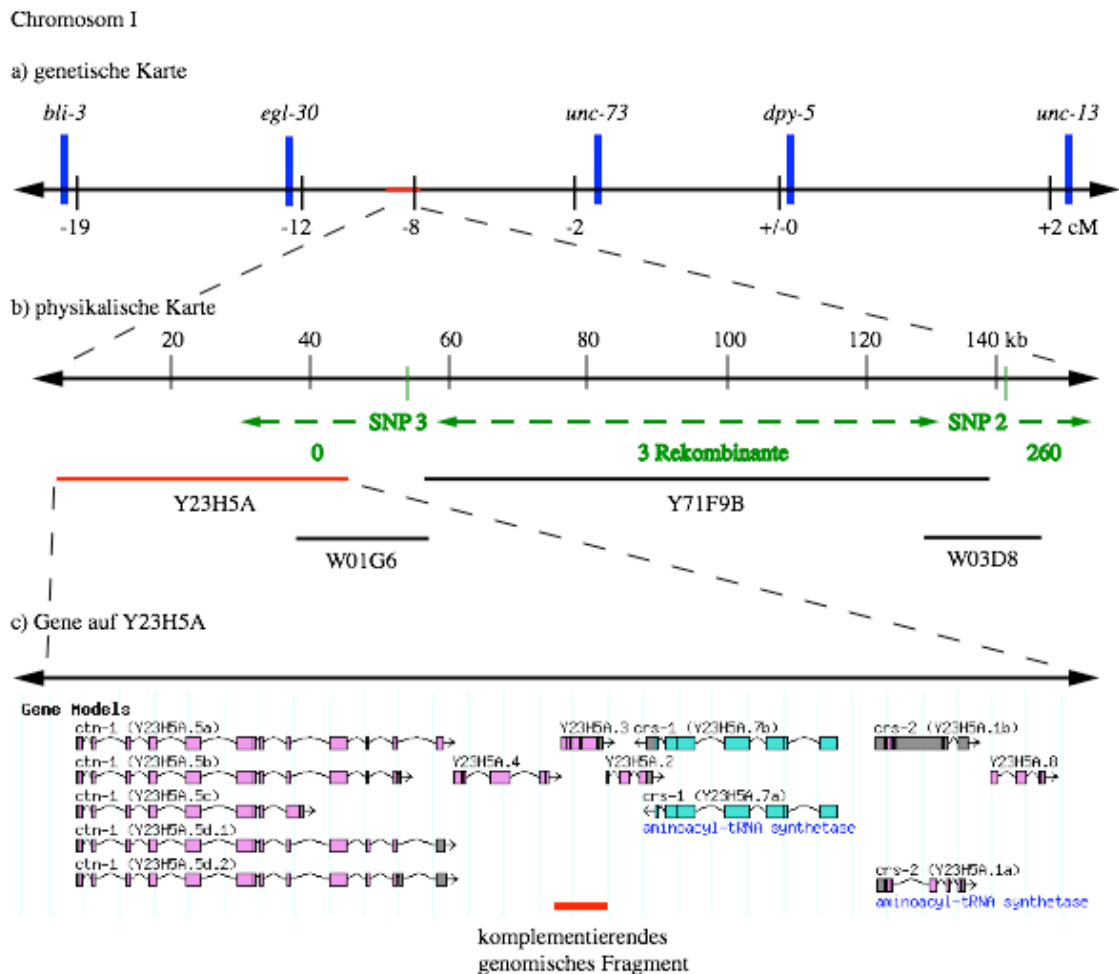


Abbildung 2.18: Position von *cib-3* auf Chromosom I: a) Genetische Karte, *cib-3* liegt nach Kreuzungsexperimenten von Ralf Schnabel und Richard Feichtinger zwischen *egl-30* und *unc-73*. b) Physikalische Karte, *cib-3* liegt links von SNP 2 auf dem komplementierenden YAC Y23H5. c) Von den Genen auf Y23H5A komplementierte das genomische Fragment von Y23H5A.3 die Mutante *cib-3(e2280)*.

Aus der Datenbank *wormbase* und aus verschiedenen anderen Veröffentlichungen lagen bereits Informationen über einige Gene in diesem Bereich vor (Fraser *et al.*, 2000; Kamath und Ahringer, 2003; Simmer *et al.*, 2003). Aus diesen Genen wurden 17 Kandidaten (Anhang 6.1, S. 153) ausgesucht, um *cib-3* möglichst schnell zu identifizieren,

und mit RNAi getestet (siehe Kapitel 4.4, S. 126). Nur drei Kandidaten zeigten nach Injektion von dsRNA einen embryonal letalen Phänotyp in der F1-Generation (siehe Tabelle 2.2). Y71F9B.4 ist ein SM Protein G, Y71F9B.10a ein Integrin-ähnliches Protein und Y71F9B.14 ein hypothetischer ORF. Kein letaler Embryo sah den Embryonen der Mutante *cib-3(e2280)* ähnlich. Zusätzlich wurden die ORFs der 17 Kandidaten auch sequenziert, es wurde aber keine Mutation gefunden. Keiner der 17 untersuchten ORFs codiert für *cib-3*.

| Position | ORF | Homologie | RNAi Phänotyp |
|----------|-----|--------------------|-----------------------|
| Y71F9B | 4 | SM Protein G | 100 % embryonal letal |
| | 10a | Integrin-ähnlich | 100 % embryonal letal |
| | 14 | hypothetischer ORF | 100 % embryonal letal |

Tabelle 2.2: Die drei Kandidaten für *cib-3*, die von den 17 untersuchten ORFs einen embryonal letalen RNAi-Phänotyp zeigten, und deren Homologien. Der RNAi-Phänotyp war in keinem Fall ähnlich zu dem von *cib-3(e2280)*-Embryonen.

Die Mutante wurde mit genomischen Fragmenten komplementiert, um die Position des Gens auf diesem Fragment endgültig zu identifizieren.

Komplementation der Mutante *cib-3(e2280)* mit dem YAC Y23H5

In *C. elegans* können Mutationen komplementiert werden, indem die temperatursensitiven Mutanten mit einer WT-Kopie des Gens transformiert werden (siehe Wilm *et al.* (1999) und Kapitel 4.4, S. 129). Für die Komplementation von *cib3(e2280)* wurden Konstrukte aus der genomischen *C. elegans* Bibliothek eingesetzt. Nach den Ergebnissen der SNP-Kartierung (siehe Abbildung 2.18, S. 49) wurden nacheinander vier Cosmide und YACs zur Transformation eingesetzt (siehe Tabelle 2.3). Jeder Vektor wurde mit dem Vektor pGK10 cotransformiert, auf dem die Sequenz für GFP unter der Kontrolle des SERCA-Promotors liegt. Der SERCA-Promotor wird spezifisch in der Körperlängsmuskulatur angeschaltet. In der F2-Generation wurden unabhängige, GFP-positive und stabil transformierte Linien mit Vektor und Cosmid bzw. YAC selektiert.

In der F3-Generation wird überprüft, welcher der Vektoren die Funktion von *cib-3* komplementiert. Nur YAC Y23H5 komplementierte das Allel *cib-3(e2280)* (siehe Abbildung 2.18b, S. 49). Die transformierten Linien waren bei restriktiver Temperatur über mehrere Generationen lebensfähig.

| Cosmid/YAC | Transformationen | unabhängige stabile Linien | Komplementation |
|------------|------------------|----------------------------|-----------------|
| W03D8 | 6 | 23 | - |
| Y71F9 | 24 | 10 | - |
| W01G6 | 6 | 18 | - |
| Y23H5 | 8 | 12 | + |

Tabelle 2.3: Nach Cotransformation eines genomischen Konstrukts und pGK10 wurden für jeden Ansatz unabhängige, stabil transformierte GFP-positive Hermaphroditen isoliert und in der F3-Generation bei restriktiver Temperatur getestet. Nur der YAC Y23H5 komplementierte das Allel *cib-3(e2280)*.

Der komplementierende YAC Y23H5 enthält 400 kb genomische DNA. Ein Teil der Sequenz von Y23H5 liegt ebenfalls auf dem Cosmid W01G6. Da Cosmid W01G6 *cib-3(e2280)* nicht komplementierte, liegt das Gen wahrscheinlich nicht in diesem Bereich des YACs. In dem restlichen Bereich des YACs finden sich 18 postulierte ORFs, die bereits in RNAi-Experimenten untersucht wurden (Fraser *et al.*, 2000; Kamath und Ahringer, 2003; Piano *et al.*, 2002; Simmer *et al.*, 2003). Für das Gen Y23H5A.3 wurde ein embryonal letaler RNAi-Phänotyp beschrieben. Um die Mutante *cib-3(e2280)* zu komplementieren, wurde ein 2.470 bp großes genomisches Fragment dieses ORFs einschließlich Promotor und 3'UTR-Sequenzen mit PCR amplifiziert, in den bakteriellen Vektor pCR4 Topo TA® kloniert und in die Mutante transformiert (siehe Kapitel 4.4, S. 129). Dieses genomische Fragment komplementierte die Mutante *cib-3(e2280)* (siehe Abbildung 2.18).

Die codierende Sequenz von *cib-3* ist nematodenspezifisch

Die codierende Sequenz in dem ORF Y23H5A.3 wurde in der Mutante *cib-3(e2280)* und im WT sequenziert und die Sequenzen miteinander verglichen (siehe Kapitel 4.5, S. 137). An der Position 733 der cDNA befindet sich eine Transition von Guanin zu Adenin. An dieser Stelle wird die Aminosäure Tyrosin (Y) im WT durch Cystein (C) ersetzt (siehe Abbildung 2.19). In verschiedenen Mutagenese-Experimenten wurden noch weitere Allele von *cib-3* isoliert. Neben dem ursprünglichen Allel *e2280* wurden die Allele *t1008*, *t1009* und *t1033* sowie mehrere Reversionsallele von *e2280* und *t1009*

isoliert. In allen Allelen wurde die gleiche Mutation wie in *e2280* gefunden (siehe Diskussion, Kapitel 3.2, S. 102).

Die Sequenz von Y23H5A.3 wurde mit computergestützten Methoden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) analysiert. Innerhalb der Klasse der Nematoden ist das Gen hochkonserviert (siehe Abbildung 2.19). Strukturanalysen bei Datenbanken wie swiss-prot (<http://expasy.org/sprot/>) zeigen nur sehr geringe Ähnlichkeiten mit anderen Proteinen. Aus der Analyse dieser Daten lassen sich keine Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins ziehen.

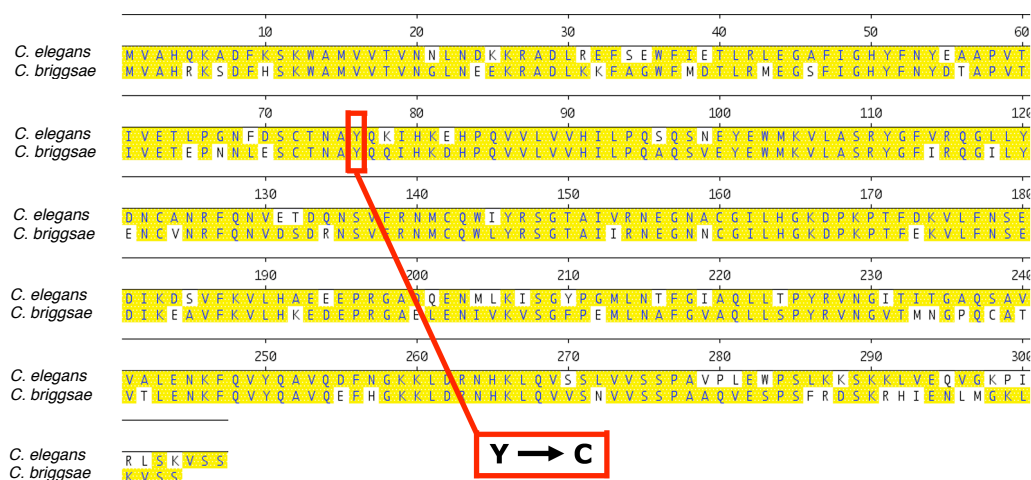


Abbildung 2.19: Der ORF *cib-3* hat Homologien zu Genen in anderen Nematoden. Die Mutation in *cib-3(e2280)* liegt an Position 733 der cDNA. Das Protein hat bisher keine bekannte Funktion.

Um Hinweise auf die Funktion zu bekommen, wurde die Auswirkung von RNAi-Experimenten auf die Embryogenese untersucht.

2.10 In RNAi-Experimenten von *cib-3* wird der *cib-3*-Phänotyp kopiert

In dem WT-Stamm und in der Mutante *cib-3(e2280)* wurden RNAi-Experimente von *cib-3* durchgeführt.

Kopie des Phänotyps von *cib-3(e2280)* durch *cib-3*-RNAi in Wildtyp

Zuerst wurde die dsRNA von *cib-3* in junge, adulte WT-Hermaphroditen injiziert, um den Phänotyp von *cib-3*-RNAi festzustellen. Bereits 15 h nach der Injektion wurde in der F1-Generation bei 25°C ein embryonal letaler Phänotyp beobachtet. Die Embryonen wurden unter dem 4D-Mikroskop aufgenommen und mit homozygoten *cib-3(e2280)*-Embryonen verglichen. Zu Beginn der Entwicklung konnten keine Defekte festgestellt

werden, jedoch starben die RNAi-Embryonen mit etwa 250 Zellen terminal im gleichen Stadium wie die Mutante (siehe Abbildung 2.20).

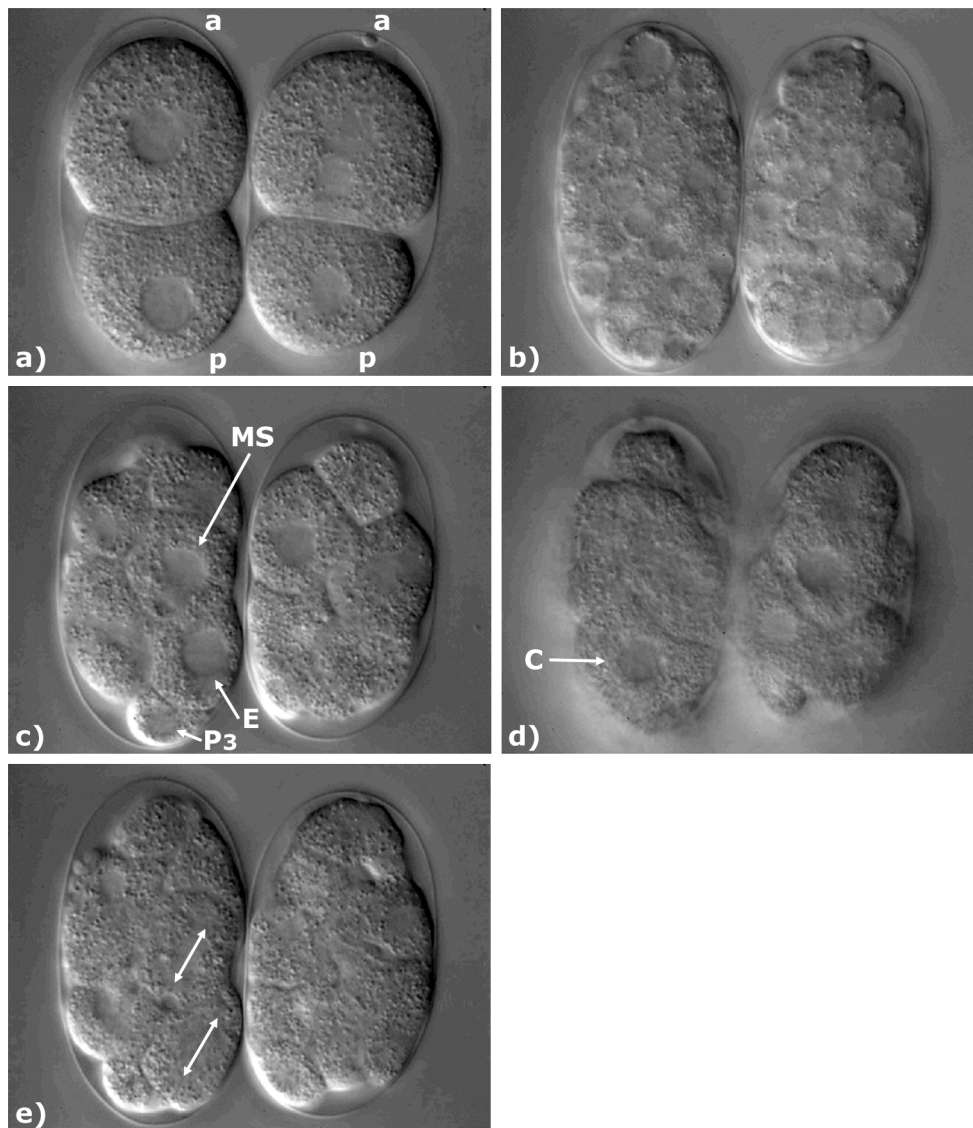


Abbildung 2.20: Zwei WT-Embryonen mit *cib-3*-RNAi bei 25°C und 26 h nach der Injektion. Beide Embryonen bildeten das 2-Zell-Stadium normal (a). Im terminalen Phänotyp sind etwa 250 Zellen zu sehen, die durch veränderte und verzögerte Teilungen unterschiedlich groß sind (b). Die P-Zellinie teilte sich immer wie in WT asymmetrisch (c) und d), die C-Zelle ist in der unteren Ebene deutlich größer als die P3-Zelle oben). Im linken Embryo sind die Defekte in der EMS-Zelllinie gut zu sehen, die Zellen E und MS teilten sich verzögert und gleichzeitig (e). Anterior (a) und posterior (p) sind in (a) gekennzeichnet.

In diesem Stadium waren die Zellen im Vergleich zu WT-Embryonen sehr unterschiedlich groß, was auf veränderte und verzögerte Zellteilungen gegenüber WT zurückzuführen ist. Die P-Zellen teilten sich wie in WT immer asymmetrisch (siehe Abbildung 2.20c und d, die P3-Zelle war kleiner als ihre Schwesterzelle C in einer

anderen Fokusebene). Ein auffälliger Defekt zeigt sich z.B. im linken Embryo in der EMS-Zelllinie, denn die Zellen E und MS teilten sich stark verzögert (nur 1 min. vor der D-Zelle statt 5 min.) und genau gleichzeitig (statt mit 2 min. Abstand). Dieser Defekt in der EMS-Zelllinie war auch der erste, der in der Mutante *cib-3(e2280)* beobachtet wurde. Der RNAi-Phänotyp der Embryonen war sehr variabel, die EMS-Zelllinie war in den Embryonen zu verschiedenen Teilungsmustern verändert.

Der Phänotyp der RNAi-Embryonen ist mit dem Phänotyp der *cib-3(e2280)*-Embryonen vergleichbar. Diese Ähnlichkeit der Phänotypen bildet eine wichtige Voraussetzung für spätere Untersuchungen zur Identität der Zellschicksale (siehe Kapitel 2.15, S. 74 und 2.17, S. 81). Um die Funktion des Gens *cib-3* zu finden, wurde versucht, die restliche Funktion des Gens mit RNAi in der Mutante *cib-3(e2280)* weiter zu reduzieren (siehe auch Kapitel 2.3, S. 23)

Reduktion der Genfunktion mit *cib-3*-RNAi in *cib-3(e2280)*

Für das Gen *cib-3* ist bisher nur das Allel *e2280* bekannt. In der Diplomarbeit (Feichtinger, 1990) wird nach Kreuzungen mit Defizienzen festgestellt, dass das Allel noch eine gewisse Funktion besitzt. Es stellt sich also die Frage, wie Embryonen aussehen, in denen die Genfunktion noch weiter reduziert wird (siehe auch Kapitel 2.3, S. 23). Dies war möglich durch dsRNA-Injektion von *cib-3* in die Mutante *cib-3(e2280)*. Die Embryonen der F1-Generation wurden bei 25°C am 4D-Mikroskop ausgewertet. Bereits 10 h nach der Injektion starben die Embryonen (siehe Abbildung 2.21). Die frühen Stadien wurden normal gebildet, aber die Embryonen starben relativ früh mit 100 Zellen. Genau wie der terminale Phänotyp in der Mutante traten auch hier durch veränderte und verzögerte Teilungen unterschiedlich große Zellen auf. In etwa 50 % der Embryonen teilten sich P-Zellen symmetrisch, die EMS-Zelllinie ist ebenfalls verändert. Erstmals wurden wieder symmetrische Teilungen der P2-Zelle beobachtet. Die Tochterzellen verhielten sich jedoch nicht wie in *cib-1(e2300)*-Embryonen. Während in *cib-1*-Embryonen die P-Zelllinie in die EMS-Zelllinie transformiert wurde, teilten sich in *cib-3*-Embryonen die Zellen synchron weiter. In anderen Embryonen teilten sich die Zellen nach einer symmetrischen Zellteilung ebenfalls synchron.

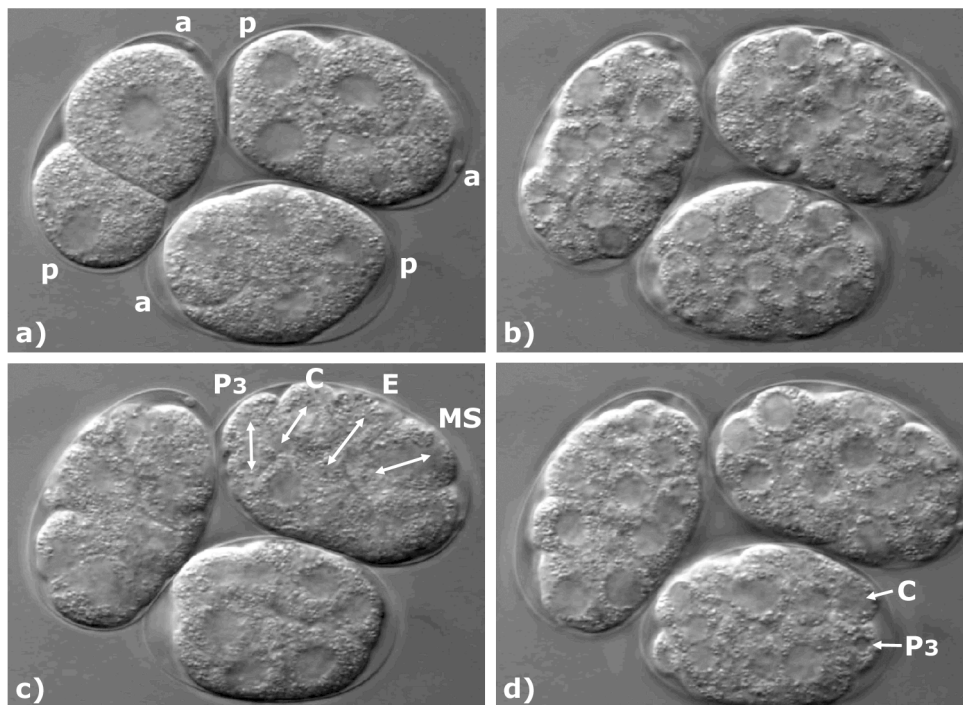


Abbildung 2.21: Drei *cib-3(e2280)*-Embryonen mit *cib-3*-RNAi 20 h nach der Injektion bei 25°C. a) Die frühen Stadien der Embryonen sehen normal aus. b) Terminal wurden etwa 100 Zellen mit verschiedener Größe gebildet. In einen Embryo (rechts oben) teilte sich die P2-Zelle symmetrisch und in der folgenden Teilungsrunde teilten sich alle vier Tochterzellen gleichzeitig (c), weiße Pfeile). d) In dem anderen Embryo (Mitte unten) teilte sich die P3-Zelle symmetrisch (weiße Pfeile). Anterior (a) und posterior (p) sind in a) gekennzeichnet.

Durch die Injektion von *cib-3*-dsRNA in die Mutante *cib-3(e2280)* tritt der embryonal letale Phänotyp mit den symmetrischen Zellteilungen früher auf als in *cib-3*-Embryonen ohne RNAi. So teilen sich in *cib-3*-Embryonen mit *cib-3*-RNAi bereits P2-Zellen symmetrisch (und nicht P3-Zellen) und die EMS-Zelllinie ist immer verändert. Das Allel *cib-3(e2280)* ist also wirklich kein Nullallel, und die Funktion des Gens kann mit RNAi noch weiter reduziert werden. Wahrscheinlich ist dieser frühere Phänotyp auch nicht der Nullphänotyp, da nach RNAi noch eine restliche Genfunktion bestehen kann (Büssing, 2005).

Die Injektion von *cib-3*-dsRNA ist effektiver als die Methode der Fütterung

In *C. elegans* werden zwei verschiedene RNAi-Methoden zur Reduktion der Genfunktion genutzt (siehe Kapitel 4.4, S. 126). Einerseits wird die Methode der dsRNA-Injektion benutzt, andererseits die Methode der ds-RNA-Fütterung. Aus der Literatur ist bekannt, dass für beide Methoden unterschiedliche Effizienzen beobachtet werden. Im

Folgenden wird untersucht, welche der beiden RNAi-Methoden effizienter den *cib-3*-Phänotyp erzeugt.

Die Methode der Injektion von dsRNA in die Gonaden junger Hermaphroditen ist sehr effizient, um die Menge eines Genprodukts in der frühen Embryogenese zu reduzieren (Fire *et al.*, 1998). In den meisten Veröffentlichungen über RNAi in *C. elegans* wird jedoch die Methode der Fütterung von dsRNA verwendet, um dsRNA in Embryonen zu bringen (Fraser *et al.*, 2000). Dazu werden Hermaphroditen mit Bakterien gefüttert, die dsRNA produzieren. Die Bakterien enthalten einen Vektor (L4440), auf dem zur Herstellung der dsRNA eine Gensequenz zwischen zwei Promotoren liegt (siehe Kapitel 4.4, S.126, und 2.5, S. 35). Nach der Induktion der Promotoren wird das Gen aus beiden Richtungen abgelesen und die Bakterien bilden dsRNA. Bei der Firma *geneservice Ltd.* wurde ein Bakterienstamm gekauft, der ein Plasmid für die dsRNA-Produktion von *cib-3* trägt. Für *cib-3* wurde mit der Fütterungsmethode embryonale Letalität beobachtet (Fraser *et al.*, 2000; Kamath und Ahringer, 2003; Piano *et al.*, 2002; Simmer *et al.*, 2003).

36 h nach der Fütterung mit RNAi von *cib-3* in WT-L4-Larven bei 25°C wurden die Embryonen am 4D-Mikroskop aufgenommen und ausgewertet. 50 % der Embryonen zeigten ähnliche Defekte wie *cib-3(e2280)*. Die frühe Entwicklung der Embryonen verlief normal (siehe Abbildung 2.22). Im terminalen Phänotyp bildeten sich etwa 150 Zellen, die ähnlich zu den Injektionsaufnahmen und den *cib-3(e2280)*-Embryonen unterschiedlich groß waren. Im linken Embryo wurde ein verändertes Zellteilungsmuster in der EMS-Zelllinie beobachtet. Die E-Zelle teilte sich 2 min. vor der MS-Zelle statt 2 min. später wie im WT-Embryo. Im mittleren Embryo teilte sich P2 symmetrisch in zwei verschiedene Ebenen (hier daher nicht dargestellt).

Mit der Methode der Fütterung von dsRNA wird der gleiche Phänotyp in den Embryonen erzeugt wie in der Mutante *cib-3(e2280)* oder bei den dsRNA-Injektionsexperimenten. Der Effekt des RNAi setzt nach der Fütterung aber erst sehr spät ein und ist etwas schwächer als nach der dsRNA-Injektion. Es überlebten 30 % der Embryonen. Unter den letalen Embryonen zeigen auch nur 50 % den *cib-3*-Phänotyp. Zum Vergleich wurden auch L4-Larven von *cib-3(e2280)* mit *cib-3*-dsRNA gefüttert. Der Effekt des RNAi tritt ebenfalls nicht ganz so früh wie nach der Injektion auf. Die

Methode der Fütterung ist, zumindest mit der genomischen Sequenz von *cib-3*, nicht so effizient wie die Injektion. Die dsRNA-Fütterung kann aber als Alternative eingesetzt werden, falls die Injektion oder die Verwendung der Mutante nicht möglich ist (siehe Kapitel 2.15, S. 74, und 2.17, S. 81).

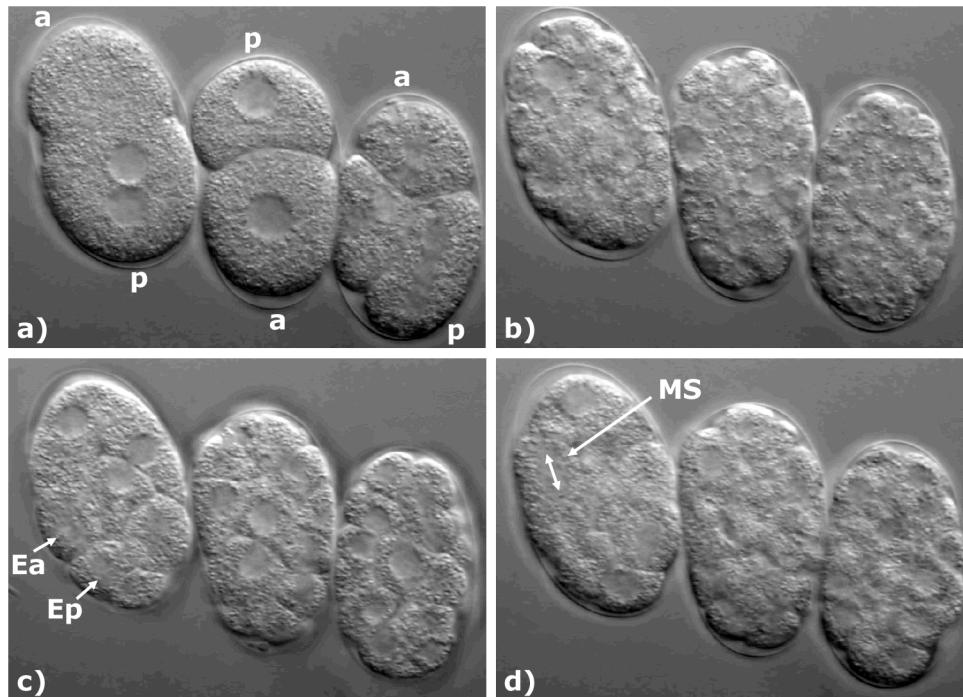


Abbildung 2.22: Drei WT-Embryonen mit *cib-3*-dsRNA als Futter. a) Die frühe Embryogenese von der Befruchtung an verläuft in den Embryonen normal. Im rechten Embryo teilte sich die AB-Zelle gerade, die Zellkerne sind nicht zu sehen. Anterior (a) und posterior (p) sind gekennzeichnet. b) Terminal entwickelten die Embryonen etwa 150 Zellen, die durch ein verändertes und verzögertes Zellteilungsmuster verschieden groß waren. c) und d) stellen zwei verschiedene Ebenen des Embryos zum gleichen Zeitpunkt dar. Im linken Embryo teilte sich die E-Zelle bereits in die Zellen Ea und Ep (in c), die Zellen sind markiert), aber die MS-Zelle teilte sich erst danach (in d), weißer Pfeil). Die E-Zelle teilte sich 2 min. vor statt 2 min. nach MS wie in WT-Embryonen. Im mittleren Embryo teilte sich P2 symmetrisch (hier nicht dargestellt, da auch hier beide Tochterzellen in verschiedenen Ebenen liegen).

Ein Nullphänotyp von *cib-3* kann jedoch mit RNAi nicht erreicht werden. Das Allel *cib-3(e2280)* hat eine Restaktivität. Im Folgenden wird überprüft, ob in *cib-3(e2280)* die G2-Zellzyklus-Kontrolle wie in *cib-1(e2300)* aktiviert wird.

2.11 Keine Aktivierung der Zellzyklus-Kontrolle in *cib-3(e2280)*

Da der Phänotyp von *cib-3(e2280)* dem von *cib-1(e2300)*-Embryonen sehr ähnlich sieht, können die beiden Gene auch an gleichen Prozessen im Embryo beteiligt sein. Wenn beide Genprodukte eine Voraussetzung für die Replikation sind, kann auch in

cib-3-Embryonen die G2-Zellzyklus-Kontrolle aktiviert werden. Um dies zu überprüfen, wurde mit der Mutante *cib-3(e2280)* ab dem L4-Larvenstadium ein RNAi-Experiment (siehe Kapitel 2.5, S. 35) mit den beiden G2-Zellzyklus-Kontrollpunkt-Kinasen *atl-1* und *chk-1* durchgeführt. Durch dieses RNAi-Experiment wird während der Embryonalentwicklung die Zellzyklus-Kontrolle in der G2-Phase inaktiviert (Brauchle *et al.*, 2003). Bei *cib-1*-Embryonen führt das RNAi-Experiment zu einem Zellteilungsmuster wie in WT-Embryonen. Wenn die beiden Genfunktionen von *cib-1* und *cib-3* am gleichen Prozess beteiligt sind, muss nach *atl-1 chk-1*-RNAi auch in *cib-3*-Embryonen das Zellteilungsmuster wie in WT-Embryonen sein. Nach der Fütterung von WT-L4-Larven mit *cib-3*-dsRNA wurden die Embryonen der F1-Generation mit dem 4D-Mikroskop aufgenommen und ausgewertet. Das Zellteilungsmuster in der Mutante *cib-3(e2280)* wurde mit dem in WT-Embryonen verglichen (siehe Tabelle 2.4).

| Genotyp der Embryonen | Futter | n | P3 nach C (min.) |
|-----------------------|--------------------|----|------------------|
| WT | OP50 | 7 | 6,0 |
| <i>cib-3(e2280)</i> | OP50 | 5 | 12,0 |
| <i>cib-3(e2280)</i> | <i>atl-1 chk-1</i> | 10 | 11,0 |

Tabelle 2.4: Der *atl-1 chk-1*-RNAi hatte keinen Einfluss auf den Zellteilungszeitpunkt in *cib-3(e2280)*-Embryonen.

Der *atl-1 chk-1*-RNAi hatte keinen Einfluss auf das Zellteilungsmuster der *cib-3*-Embryonen. In den *cib-3(e2280)*-Embryonen wird die G2-Zellzyklus-Kontrolle nicht aktiviert wie in *cib-1(e2300)*. Es gibt keinen Hinweis darauf, dass die Replikation in *cib-3(e2280)* beeinträchtigt ist. Der Phänotyp der beiden Mutanten *cib-3(e2280)* und *cib-1(e2300)* ist sehr ähnlich, aber die Proteine sind nicht am gleichen Prozess beteiligt.

2.12 *cib-3* interagiert genetisch mit *t1025*

In *C. elegans* können Interaktionspartner über Epistase-Experimente mit Mutanten identifiziert werden (Hodgkin, 2005). Die Mutante *t1025* ist in der Diplomarbeit (Feichtinger, 1990) als genetischer Interaktionspartner von *cib-3(e2280)* beschrieben worden.

Erste Beschreibung von *t1025* in der Diplomarbeit durch Richard Feichtinger

Die Mutante *t1025* wurde während einer Mutantenlese in Tübingen isoliert und ist ebenfalls temperatursensitiv und maternal embryonal letal. Die Embryonen entwickeln sich meist bis zur Morphogenese, wobei sich die Tochterzellen der E-Zelllinie zu einem anderen Zeitpunkt teilen als in WT-Embryonen. Die Mutante verhält sich genau wie *cib-3(e2280)* semidominant, d.h. auch bei heterozygoten Hermaphroditen (*t1025/+*) stirbt ein Teil der F1-Generation abhängig von der Temperatur, dem Stamm und dem Hermaphroditen. Die Interaktion mit *cib-3* zeigt sich in der F1-Generation von Hermaphroditen, die für beide Gene heterozygot (*cib-3(e2280)/t1025*) sind. Bei der restriktiven Temperatur ist die Letalität dieser Embryonen gegenüber der von Embryonen von Hermaphroditen herabgesetzt, die nur für eins der beiden Gene *t1025* oder *cib-3(e2280)* heterozygot sind – also (*t1025/+*) oder (*cib-3(e2280)/+*).

Weitere Charakterisierung des Phänotyps von der Mutante *t1025*

Nach der interessanten Beschreibung von Richard Feichtinger wurde die Mutante *t1025* in dieser Arbeit genauer charakterisiert, um einen Hinweis auf die Funktion des Gens zu bekommen. 1990 wurde *t1025* in die Dauer-Stammhaltung des Labors übernommen und seitdem immer weiter gezüchtet. Eine Überprüfung des Stamms ergab, dass der Effekt der Mutation innerhalb von 14 Jahren beinahe verschwunden ist. Der Stamm war 2004 bei restriktiver Temperatur nur zu ca. 10 % maternal embryonal letal. Dieses Verhalten ist auch von anderen semidominanten Mutanten wie *cib-3(e2280)* bekannt. Ob dieser Semidominanzeffekt durch kompensatorische Mutationen oder durch epigenetische Programmierung ausgelöst wird, ist bisher nicht geklärt. Der ursprüngliche Effekt der Mutation tritt meist wieder auf, wenn semidominante Mutationen in einen anderen genetischen Hintergrund gebracht werden. Deshalb wurde die Mutante mit dem WT-Stamm gekreuzt, um den 1990 beschriebenen Phänotyp zu bestätigen. Bereits nach der ersten Kreuzung war der Effekt der Mutation in der F2-Generation wieder sehr deutlich zu sehen. Ein zweites Auskreuzen mit WT war nicht möglich, da die heterozygote F1-Generation dann durch die Semidominanz der Mutation steril war. Um festzustellen, zu welchem Zeitpunkt das Genprodukt für den Embryo essentiell ist, wurde die temperatursensitive Phase der Mutante bestimmt. Dazu wurden Embryonen auf restriktiver und permissiver Temperatur bis zu einem bestimmten Stadium inkubiert

und dann auf die jeweils andere Temperatur transferiert (siehe Kapitel 4.4, S 121). Die ts-Phase von *t1025* ist der von *cib-3(e2280)* sehr ähnlich. Das Gen *t1025* wird, genau wie *cib-3*, essentiell während der frühen Embryogenese benötigt. Auch bei einer unveränderten Inkubation bei der permissiven Temperatur starben bis zu 80 % der Embryonen, der Stamm konnte sich nur sehr langsam vermehren und war schwierig zu züchten.

Der Phänotyp der Embryonen bei 25°C wurde am 4D-Mikroskop aufgenommen. Die Embryonen entwickelten sich terminal bis zum 2-fach-Stadium (siehe Abbildung 2.23). Nach Lineageanalysen teilten sich die Nachkommen der EMS-Zelllinie zu früh. Der veränderte Teilungszyklus ist schon aus der Mutante *cib-3(e2280)* bekannt. Auch der Phänotyp der Mutante spricht, neben der genetischen Interaktion, für eine Funktion beider Gene im gleichen Prozess.

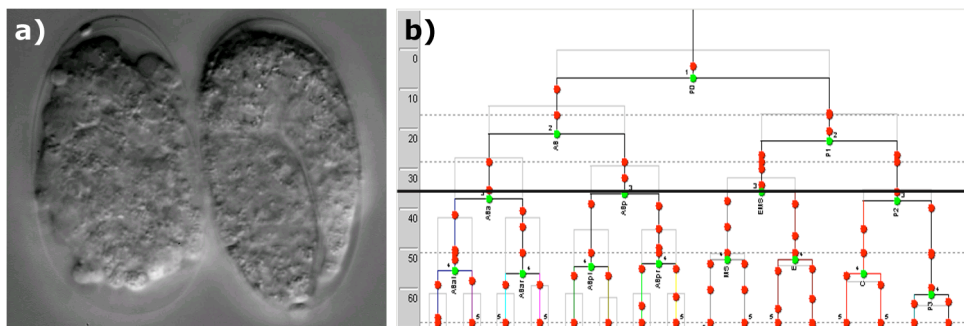


Abbildung 2.23: Die Embryonen der Mutante *t1025* starben erst im 2-fach-Stadium (a). Der erste Defekt war in der Lineage an der verfrühten Teilung in der EMS-Zelllinie zu sehen (b, schwarze Linie).

Um Hinweise auf die Funktion zu bekommen, sollte das unbekannte Gen kloniert werden. Durch die Semidominanz und die geringe Überlebensfähigkeit der Embryonen schlugen jedoch drei verschiedene Ansätze zur Klonierung fehl, so dass das Gen in dieser Arbeit nicht kloniert wurde (siehe Kapitel 4.6, S. 141). Zur Charakterisierung der Funktion von *cib-3* wurden auch mit anderen Methoden Interaktionspartner gesucht, z.B. mit der Methode des Yeast-two-Hybrid.

2.13 Identifizierung von Interaktionspartnern von *cib-3*

Mit der Methode des Yeast-two-Hybrid (Y2H) lassen sich Interaktionen zwischen zwei Proteinen *in vivo* finden (Fields und Song, 1989). Die Methode wird mit den verwendeten kommerziellen Systemen und Vektoren in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) kurz vorgestellt (siehe Kapitel 4.5, S. 139).

Das System des Yeast-two-Hybrid

Für die Durchführung des Experiments wurde das MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System der Firma Clontech benutzt (<http://www.clontech.com/>). Die DNA-bindende Domäne (BD) des Transkriptionsfaktors GAL4 ist in den Vektor pGBKT7 kloniert, die Aktivierende Domäne (AD) in den Vektor pGADT7 bzw. pACT (siehe Anhang 6.3, S. 157). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Fragment der BD auf dem Vektor pGBKT7 mit *cib-3*-cDNA fusioniert. Der Vektor enthält außerdem das Gen TRP1 zur Selektion in *S. cerevisiae*. Zur Fusion mit dem Fragment der AD standen die beiden Vektoren pGADT7 und pACT zur Verfügung, die beide zur Selektion das Gen LEU2 für die Leucin-Herstellung enthalten. Wenn die beiden Genprodukte der cDNAs, die mit den GAL4-Domänen fusioniert wurden, in *S. cerevisiae* direkt miteinander interagieren, wird das Reportergen transkribiert. Als Reportergene wurden die Gene HIS3 und ADE2 verwendet. Der auxotrophe Stamm AH109 wächst auf entsprechenden Mangelmedien nur, wenn es eine Interaktion der zu testenden cDNA mit CIB-3 gibt. Es wurden unterschiedliche cDNAs mit der AD fusioniert, um Interaktionspartner von CIB-3 zu identifizieren.

CIB-3 interagiert im Yeast-two-Hybrid mit sich selbst

Die Suche nach neuen Interaktionspartnern eines Proteins mit dem Yeast-two-Hybrid ist nur möglich, wenn das Protein selbst keine DNA-bindende oder Transkription-aktivierende Domäne enthält. Um die sonst entstehenden falsch-positiven Ergebnisse zu minimieren, wurden die beiden Vektoren pGBKT7 und pGADT7 nach der Fusion mit der *cib-3*-cDNA einzeln in AH109 transformiert. CIB-3 war ohne Interaktionspartner nicht in der Lage, an die UAS zu binden oder die Transkription der Reportergene zu aktivieren. Wenn beide Vektoren gleichzeitig in die Hefe cotransformiert wurden, interagierte CIB-3 mit sich selbst (siehe Abbildung 2.24a).

Nach dieser Charakterisierung von CIB-3 stand fest, dass das Protein für die Suche nach unbekannten Interaktionspartnern mit der Yeast-two-Hybrid-Methode geeignet ist. Das Protein enthält keine Domäne, die in *S. cerevisiae* an die UAS bindet oder die Transkription aktiviert. Im zweiten Schritt wurden neue Interaktionspartner von CIB-3 gesucht.

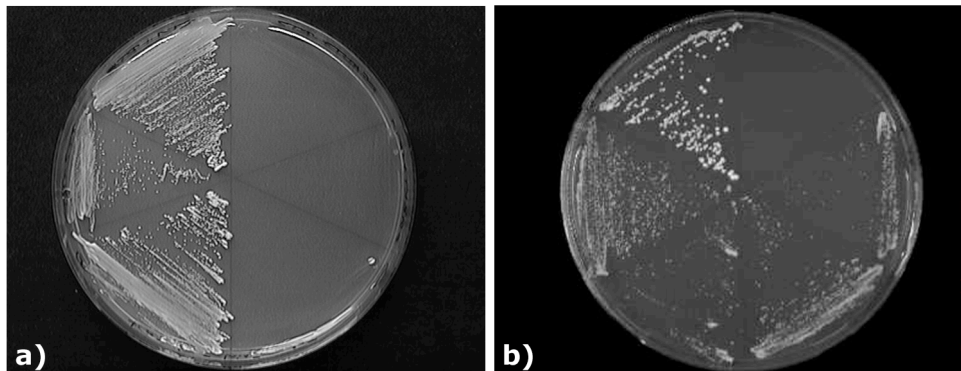


Abbildung 2.24: Zwei typische Yeast-two-Hybrid-Agarplatten mit Mangelmedium ohne Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin. Das Wachstum der Stämme zeigte die direkte Interaktion zweier Proteine. a) Zur Charakterisierung von CIB-3 von oben im Uhrzeigersinn: Negativkontrolle, pGBKT7-*cib-3* (kein Wachstum), pGADT7-*cib-3* (kein Wachstum), pGBKT7-*cib-3* und pGADT7-*cib-3* (Wachstum), 1. Interaktionspartner (Wachstum), Positivkontrolle. b) Um Interaktionspartner zu finden, wurden in AH109 mit pGBKT7-*cib-3* verschiedene weitere cDNAs getestet. Von oben im Uhrzeigersinn: Negativkontrolle, 1. Interaktionspartner F57F5.1, 2. Interaktionspartner F44C4.3, 3. Interaktionspartner W07B8.5, 4. Interaktionspartner K04D7.1, Positivkontrolle.

Im Y2H interagieren mehrere Proteine spezifisch mit CIB-3

Um neue Interaktionspartner von CIB-3 zu finden, wurde eine *C. elegans*-cDNA-Bank von der Firma DevGen in dem Vektor pACT (mit AD-Domäne) verwendet. Die cDNA-Bank wurde in den Stamm AH109 mit pGBKT7-*cib-3* transformiert und auf Interaktion getestet (siehe Abbildung 2.24b und Kapitel 4.5, S. 139). Positive Klone wurden isoliert, zur Sicherheit noch einmal auf Interaktion getestet und sequenziert (siehe Tabelle 2.5). Am häufigsten wurde die Sequenz von K04D7.1 (grün markiert) gefunden, sie kam in 1/3 der untersuchten 93 Kolonien vor. Besonders auffällig war auch eine ganze Gruppe von konservierten Proteinen (rot), den Cathepsin L Cystein Proteinasen. Zusammen genommen bildete diese Gruppe 22 % aller Sequenzen. Die Sequenzen anderer Proteine interagierten nur selten mit CIB-3, sie wurden nur ein- oder zweimal gefunden. Sie wurden in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

| Genname oder ORF | Homolog | Häufigkeit |
|---------------------------|--|------------|
| K04D7.1 | ähnlich zu G-Protein beta-Untereinheit | 32 |
| F57F5.1 | Cathepsin L Cystein-Proteinase | 10 |
| <i>cpr-4</i> (F44C4.3) | Cathepsin L Cystein-Proteinase | 5 |
| <i>cpr-5</i> (W07B8.5) | Cathepsin L Cystein-Proteinase | 7 |
| <i>cpr-1</i> (C52E4.1) | Cathepsin L Cystein-Proteinase | 2 |
| <i>eft-2</i> (F25H5.4) | Elongationsfaktor | 7 |
| <i>map-2</i> (Y116A8A.2) | Methionin Aminopeptidase | 5 |
| F08G5.7 | UDP-Glucuronyltransferase ähnlich (Lectin bindend) | 2 |
| F27D4.5 | E1 Pyruvate-Dehydrogenase /Transketolase | 2 |
| LLC1.3 | Dihydrolipoamid Dehydrogenase | 2 |
| <i>snf-5</i> (R07E5.3) | Snf5 (Swi/SNF) | 2 |
| <i>spc-1</i> (K10B3.10) | Spektrin alpha-Kette | 1 |
| <i>act-4</i> (M03F4.2) | Aktin | 1 |
| <i>alh-9</i> (F01F1.6) | Aldehyd-Dehydrogenase | 1 |
| <i>isp-1</i> (F42G8.12) | Eisen-Sulfur Protein (mitoc.) | 1 |
| <i>wrt-2</i> (F52E4.3) | WaRThog | 1 |
| <i>map-1</i> (Y37E11AL.7) | Methionin Aminopeptidase | 1 |
| <i>lin-5</i> (T09A5.10) | neu (cytokinesis ect.) | 1 |
| <i>unc-52</i> (C38C6) | Heparan-Sulfat Proteoglycan | 1 |
| <i>egl-21</i> (F01D4.4) | | 1 |
| F45B8.3 | | 1 |
| F35C5.6 | Lectin C-typ Domaine, von-Willebrandt-factor A | 1 |
| F56D2.1 | Peptidase (mitochondrial) | 1 |
| W02A2.3 | RNAPII Degradationsfaktor | 1 |
| T21H3.1 | putative Lipase | 1 |
| T01B11.2 | putative Aminopeptidase | 2 |
| F45B8.3 | putativ Aktin-Assemblierung | 1 |
| | | 93 |

Tabelle 2.5: Ergebnisse aus der Yeast-two-Hybrid-Suche nach neuen Interaktionspartnern von CIB-3. Insgesamt wurden 93 interagierende Hefekolonien isoliert und die cDNA-Fragmente sequenziert. Am häufigsten wurde die Sequenz von K04D7.1 identifiziert (grün), sie war in 1/3 aller untersuchten Sequenzen enthalten. Als zweiter Interaktionspartner kamen mit 22 % aller Sequenzen mehrere Kandidaten in Frage, die alle zu derselben Proteinfamilie der Cathepsine L gehören.

Mit dem Yeast-two-Hybrid wurden mehrere neue Proteine identifiziert, die mit CIB-3 interagieren. Die Interaktionen wurden aber systembedingt nur im Zellkern der Hefe beobachtet. Über die Lokalisation dieser Proteine in *C. elegans* ist bisher nichts bekannt, oft bestehen große Unterschiede zur Hefe. Proteine können im Yeast-two-Hybrid miteinander interagieren, ohne dass unter endogenen Bedingungen im ursprünglichen Organismus eine Bindung zu beobachten ist. Das Protein K04D7.1 und die Cathepsine sind also potentielle Interaktionspartner von CIB-3. Sie wurden deshalb zur Überprüfung der Interaktion in *C. elegans* charakterisiert.

RACK-1 interagiert auch in *C. elegans* mit CIB-3

In jeder dritten Sequenz wurde bei der Yeast-two-Hybrid-Suche der gleiche ORF identifiziert. Dieses Gen wurde als Kandidat für einen Interaktionspartner von CIB-3 als erstes in *C. elegans* charakterisiert. Das Gen codiert nach Datenbankanalysen für das konservierte Protein RACK1 (*receptor activated C-type kinase*). Dieses Gen wurde zuerst in *S. cerevisiae* beschrieben, es ist von *C. elegans* bis *H. sapiens* sehr stark konserviert. RACK1 aktiviert G-Protein vermittelte Signalwege. Diese Signalwege können durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte aktiviert werden oder auch mit innerzellulären Signalen zusammenhängen. Das Protein enthält mehrere WD40-Domänen. WD40-Domänen kommen in vielen eukaryotischen Proteinen vor, sie bestehen aus bis zu 40 AS mit Wiederholungen eines Dipeptids aus Tryptophan (W) und Asparaginsäure (D). Proteine mit diesen Domänen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen in großen Proteinkomplexen, wobei ihre Spezifität in den Sequenzen außerhalb der WD40-Domänen festgelegt wird. Diese Proteinkomplexe können von Signaltransduktion und Regulation der Transkription bis zur Zellzyklus-Kontrolle und Apoptose an den verschiedensten Prozessen beteiligt sein (Croze *et al.*, 2000; Hamilton und Wright, 1999; Wang *et al.*, 2003). Bisher ist keine Funktion des Gens K04D7.1 in der Embryonalentwicklung oder in der Keimbahn bekannt.

In *C. elegans* liegt das Gen K04D7.1 auf Chromosom IV bei $4,56 \pm 0,001$ cM. Die cDNA ist 978 Nukleotide lang und codiert für ein Protein von 325 AS. Als Proteindomänen wurden in der Datenbank SwissProt 7 WD-40 Domänen identifiziert. Das Gen liegt in der gleichen Region wie das Allel *t1025*, doch bei Sequenzierungen von *t1025* in dem ORF K04D7.1 wurde keine Mutation gefunden. Die beiden Gene sind nicht identisch. Für das Gen K04D7.1 ist keine Mutante bekannt, aber in verschiedenen RNAi-Experimenten wurden unterschiedliche Phänotypen für *rack-1*-RNAi beschrieben (Kamath *et al.*, 2003; Simmer *et al.*, 2003; Sonnichsen *et al.*, 2005). Neben embryonaler Letalität wuchsen die Larven langsamer und die Hermaphroditen legten weniger Eier. In dieser Arbeit wurde das RNAi-Experiment von *rack-1* wiederholt. Die dsRNA wurde in junge WT-Hermaphroditen injiziert und die Embryonen der F1-Generation am 4D-Mikroskop aufgenommen.

Bereits 10 h nach der Injektion waren die Embryonen bei 25°C embryonal letal. Nach weiteren 20 h legten die injizierten Hermaphroditen keine Eier mehr. Der RNAi-Effekt nahm mit der Zeit zu. Embryonen, die 15 oder mehr Stunden nach der Injektion befruchtet wurden, zeigten den typischen, variablen *cib*-Phänotyp (siehe Abbildung 2.25). Die frühen Stadien wurden normal gebildet, aber es kam zu Veränderungen der EMS-Zelllinie und manchmal zu symmetrischen Teilungen in der P-Zelllinie. Die Embryonen entwickelten sich weiter als *cib-3(e2280)*-Embryonen, sie starben erst während der Elongation.

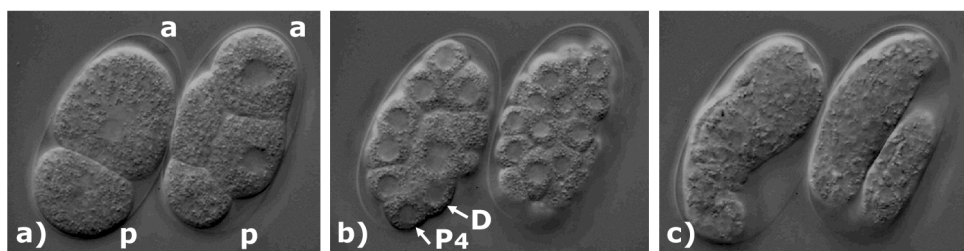


Abbildung 2.25: Zwei WT-Embryonen mit *rack-1*-RNAi 20 h nach der Injektion bei 25°C. Die Embryonen hatten den gleichen Phänotyp wie in der Mutante *cib-3(e2280)*. a) Die frühen Stadien wurden normal gebildet. b) Im linken Embryo teilte sich P3 symmetrisch, P4 und D waren gleich groß. c) Die Embryonen starben während der Elongation.

Zum Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Phänotypen wurde neben der Injektion auch die zweite RNAi-Methode verwendet (siehe Kapitel 4.4, S. 126). Der zur Fütterung eingesetzte Bakterienstamm trägt auf dem Vektor L4440 ein genomisches Fragment von *rack-1*. Nach zwei Tagen Fütterung mit dsRNA waren die Embryonen letal, der Phänotyp war etwas schwächer als nach der Injektion. Symmetrische Teilungen in der P-Zelllinie wurden sehr selten beobachtet, das Teilungsmuster der EMS-Zelllinie war oft verändert. Wie auch bei *cib-3*-RNAi (siehe 2.10, S. 55) eignete sich die Methode der Injektion besser, um die maternale RNA von *rack-1* zu reduzieren. So wurde auch *rack-1*-dsRNA in die Mutante *cib-3(e2280)* injiziert (siehe 2.10, S. 55). Es zeigte sich ein ähnlicher Effekt wie nach Injektion von *cib-3*-dsRNA in die Mutante *cib-3(e2280)*. Die mutanten Embryonen starben mit dsRNA früher als ohne dsRNA, in 40 % der Embryonen teilte sich eine P-Zelle symmetrisch. Auch durch die Reduktion von zwei verschiedenen Proteinen wurde kein früherer Defekt in den Embryonen ausgelöst, so dass kein neuer Phänotyp entstand.

Nach *rack-1*-RNAi zeigten WT-Embryonen den gleichen Phänotyp wie die Mutante *cib-3(e2280)*, daher sind die Proteine wahrscheinlich am gleichen Prozess beteiligt. Die EMS-Zellen wurden beeinträchtigt und die P-Zellen teilten sich symmetrisch. Gemeinsam mit den Ergebnissen aus dem Y2H ist der gleiche Phänotyp ein guter Hinweis auf eine direkte Interaktion der beiden Proteine in *C. elegans*. Bisher ist keine Funktion für *rack-1* in der Embryogenese oder in der Keimbahnentwicklung bekannt.

Weitere Interaktionspartner gehören zur Proteinfamilie der Cathepsine L

Bei der Yeast-two-Hybrid-Suche nach Interaktionspartnern von CIB-3 wurden vier Kandidaten gefunden, die zur Proteinfamilie der Cathepsin L Cystein Proteinasen gehören. Cystein Proteinasen sind Peptidasen und spalten unter leicht sauren Bedingungen Peptidbindungen. Der Name Cystein Proteinase stammt von einem Cystein, das sich im aktiven Zentrum des Enzyms befindet. Es werden je nach der Position, an der das Enzym die Peptidbindung spaltet, verschiedene Gruppen von Cathepsinen unterschieden. Die spezielle Gruppe der Cathepsine L ist vor allem als lysosomale Proteinase bekannt und fungiert als Carboxy-Dipeptidase. Cathepsine konnten in vielen Organismen und fast allen Geweben nachgewiesen werden (Friedrich, 1999; Hashmi *et al.*, 2002). Gerade in neuerer Zeit lassen sie sich nicht nur mit Proteinkatabolismus, sondern auch mit der Regulation und Aktivierung von einzelnen Proteinen in Verbindung bringen. Eine Beteiligung von Cathepsinen bei der Embryogenese oder der Keimbahnentwicklung ist bisher nicht bekannt.

In *C. elegans* gibt es mehr als 15 verschiedene Cathepsine L, die sich in drei Gruppen einteilen lassen. Die Cathepsindomänen innerhalb einer solchen Gruppe sind in 80 % der Proteinsequenz identisch, zwischen den Gruppen besteht nur eine Ähnlichkeit von 55 % der Proteinsequenz. Die Cathepsine F57F5.1, CPR-4, CPR-5 und CPR-1, die bei dem Yeast-two-Hybrid als Interaktionspartner von CIB-3 gefunden wurden, gehören zusammen mit CPR-6 in die gleiche Gruppe. In der Datenbank *wormbase* (<http://www.wormbase.org>) ist ein embryonal letaler RNAi-Phänotyp für F57F5.1 beschrieben worden (Kamath und Ahringer, 2003; Simmer *et al.*, 2003; Sonnichsen *et al.*, 2005). Für die anderen Mitglieder dieser Gruppe ist kein RNAi-Phänotyp bekannt. Alle fünf Cathepsine L wurden mit dsRNA-Injektion in *C. elegans* überprüft (siehe Kapitel 4.4, S. 126). Bei 25°C hatten nur die beiden Cathepsine F57F5.1 und *cpr-4*

einen RNAi-Phänotyp. Die anderen drei zeigten im RNAi keine sichtbaren Auswirkungen auf die Entwicklung der F1-Generation. Nach RNAi von *cpr-4* wurden 50 % der Hermaphroditen der F1-Generation steril. Die Entwicklung der Embryonen war nicht beeinträchtigt. Nur F57F5.1 zeigt einen embryonal letalen Phänotyp nach dsRNA-Injektion. Dieser Phänotyp wurde mit dem *cib-3*-Phänotyp verglichen.

Nur das Cathepsin L F57F5.1 interagiert in *C. elegans* mit CIB-3

In RNAi-Experimenten von F57F5.1 ist bereits ein embryonal letaler Phänotyp beschrieben worden (Kamath *et al.*, 2003; Simmer *et al.*, 2003; Sonnichsen *et al.*, 2005), der jedoch nicht näher analysiert wurde. Das Gen F57F5.1 codiert für ein Cathepsin L mit 400 AS. Die Cathepsin-Domäne reicht von AS 150 bis zum Carboxy-Ende des Proteins.

Es gibt ein Deletionsallel *tm1759* von diesem Gen, das von dem japanischen *knock-out*-Konsortium hergestellt wurde (<http://www.shigen.nig.ac.jp/c.elegans/index.jsp>). In *tm1759* ist ein Bereich in der funktionellen Domäne (von AS 120 bis AS 220) deletiert. Nach den Angaben des Konsortiums ist das Deletionsallel homozygot lebensfähig. Der Stamm *tm1759* wurde auch in dieser Arbeit analysiert, aber es wurde auch nach doppeltem Auskreuzen kein auffälliger Phänotyp beobachtet. Danach wurde der RNAi-Phänotyp von F57F5.1 mit Injektion in WT-Hermaphroditen überprüft. Bereits 15 h nach der Injektion wurde ein embryonal letaler Phänotyp beobachtet. Die letalen Embryonen wurden am 4D-Mikroskop aufgenommen und mit *cib-3(e2280)*-Embryonen verglichen. Der RNAi-Phänotyp von F57F5.1 ist mit dem *cib-3*-Phänotyp vergleichbar. Die frühe Entwicklung verlief normal. Vor allem die Entwicklung der EMS-Zelllinie wurde durch den RNAi verändert. 20 h nach der Injektion z.B. teilten sich die Zellen E und MS genau gleichzeitig (siehe Abbildung 2.26) statt mit 2 min. Abstand wie in WT-Embryonen. Terminal entwickelten sich die Embryonen bis zum prämorphogenetischen Stadium, also deutlich weiter als die *cib-3*-Embryonen. Der Phänotyp im Teilungsmuster der EMS-Zelllinie ist der gleiche wie in *cib-3(e2280)*-Embryonen, was für eine Funktion beider Proteine im gleichen Prozess spricht. Der gleiche Phänotyp ist gemeinsam mit den Ergebnissen des Y2H ein Hinweis darauf, dass die beiden Proteine *in vivo* direkt miteinander interagieren.

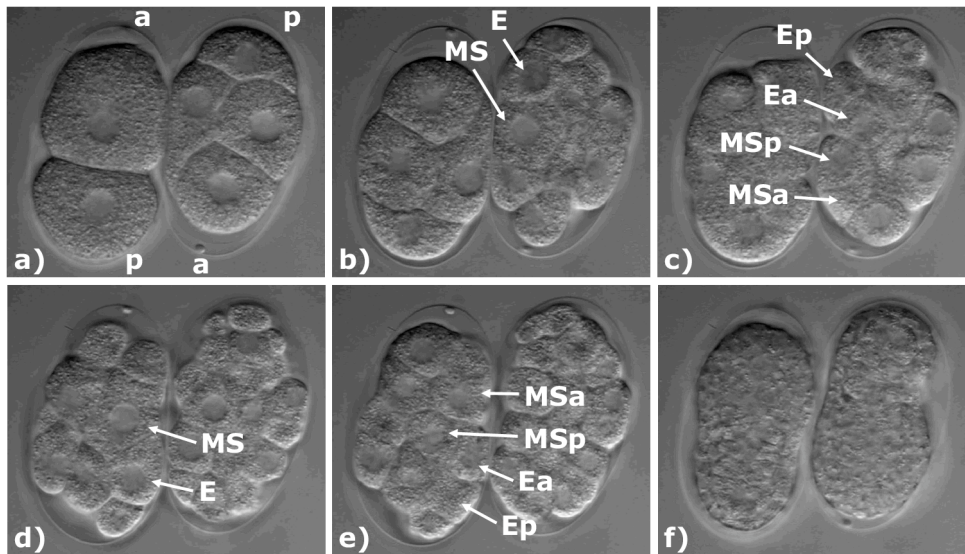


Abbildung 2.26: Zwei Embryonen nach der Injektion von F57F5.1-dsRNA in WT. Ab 15 h nach der Injektion waren die Embryonen letal. a) Die frühe Entwicklung der Embryonen verläuft wie in WT-Embryonen. Anterior (a) und posterior (p) sind gekennzeichnet. b) – e) In der weiteren Entwicklung kam es zu veränderten Teilungsmustern in der EMS-Zelllinie. b) Im rechten Embryo war die MS-Zelle größer als die E-Zelle. c) Beide Zellen teilten sich gleichzeitig weiter statt mit 2 min. Abstand wie in WT-Embryonen. d) Im linken Embryo war genau der gleiche Phänotyp der E- und MS-Zellen zu finden wie im rechten. e) Die beiden Zellen teilten sich ebenfalls genau gleichzeitig weiter. f) Die Embryonen entwickelten sich bis ins prämorphogenetische Stadium und starben dann.

Von den fünf verschiedenen Cathepsin L Proteinen, die nach dem Y2H potentiell Interaktionspartner von CIB-3 sein können, wurde nur das Protein F57F5.1 in *C. elegans* bestätigt. Bisher ist keine Funktion des Proteins während der Embryonalentwicklung in *C. elegans* oder in anderen Organismen bekannt.

2.14 CIB-3 lokalisiert in allen Zellen im Cytoplasma

cib-3(e2280)-Embryonen entwickeln bei restriktiver Temperatur hauptsächlich Defekte in der P-Zelllinie. Dieser Phänotyp lässt vermuten, dass das Protein CIB-3 eine Funktion in diesen Zellen übernimmt. Das Protein muss dazu in diesen Zellen exprimiert werden. Um das Expressionsmuster von *cib-3* zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Expressionskonstrukte hergestellt. Für das erste Konstrukt wurde der *cib-3*-Promotor vor den ORF von YFP (*yellow fluorescent protein*) kloniert. Das zweite ist ein CIB-3-GFP-Fusionskonstrukt.

Der *cib-3*-Promotor wird auf einem Array nicht exprimiert

Zunächst wurde die Aktivität des *cib-3*-Promotors mit dem Promotor::YFP-Konstrukt analysiert, um die Dosis des Proteins nicht zu verändern. Aus den Komplementations- und RNAi-Experimenten (siehe Kapitel 2.9 und 2.10) ist bekannt, dass die Funktion von CIB-3 mengenabhängig ist und die Embryonen sehr empfindlich auf eine falsche Menge des Proteins reagieren. Der Promotor wurde in einen entsprechenden Vektor kloniert und dahinter im Leserahmen der ORF für YFP (siehe Anhang 6.3, S. 158). Dieses YFP-Konstrukt wurde mit dem Vektor pBX zur Selektion in *pha-1(e2123)*-Hermaphroditen cotransformiert (siehe Kapitel 4.4, S. 129). Der Vektor pBX trägt zur Komplementation ein genomisches Fragment von *pha-1* (Schnabel, 1990). Die stabilen Linien wurden am 4D-Mikroskop ausgewertet.

In der frühen Embryonalentwicklung bis zum 150-Zell-Stadium war keine YFP-Fluoreszenz zu beobachten (Abbildung 2.27). Die Expression begann erst danach und nahm bis zum 400-Zell-Stadium weiter zu, um dann wieder abzunehmen. In beiden Embryonen variiert das Expressionsmuster innerhalb der Zelllinie sehr stark. In manchen Embryonen leuchteten nur einzelne Zellen oder einzelne Gruppen von Zellen. Diese Gruppen stammten von verschiedenen Blastomeren wie AB, EMS oder D ab. Beim Vergleich der Embryonen wird deutlich, dass es kein einheitliches Expressionsmuster gibt.

Das Fehlen der Expression in der frühen Embryogenese war unerwartet, aber es kann über den Mechanismus des *array silencing* erklärt werden (Kelly *et al.*, 1997; Stinchcomb *et al.*, 1985). Extrachromosomale Arrays werden oft nicht maternal exprimiert. Danach beginnt die zygotische Expression erst ab dem 100-Zell-Stadium. Wahrscheinlich wurde auch das Promotor-YFP-Konstrukt nicht maternal exprimiert. Über die Aktivität des *cib-3*-Promotors während der frühen Embryogenese kann deshalb keine Aussage gemacht werden. Um auf die Expression von Genen auf dem Array zu selektieren, wurde in einem parallelen Ansatz ein CIB-3::GFP-Fusionskonstrukt verwendet.

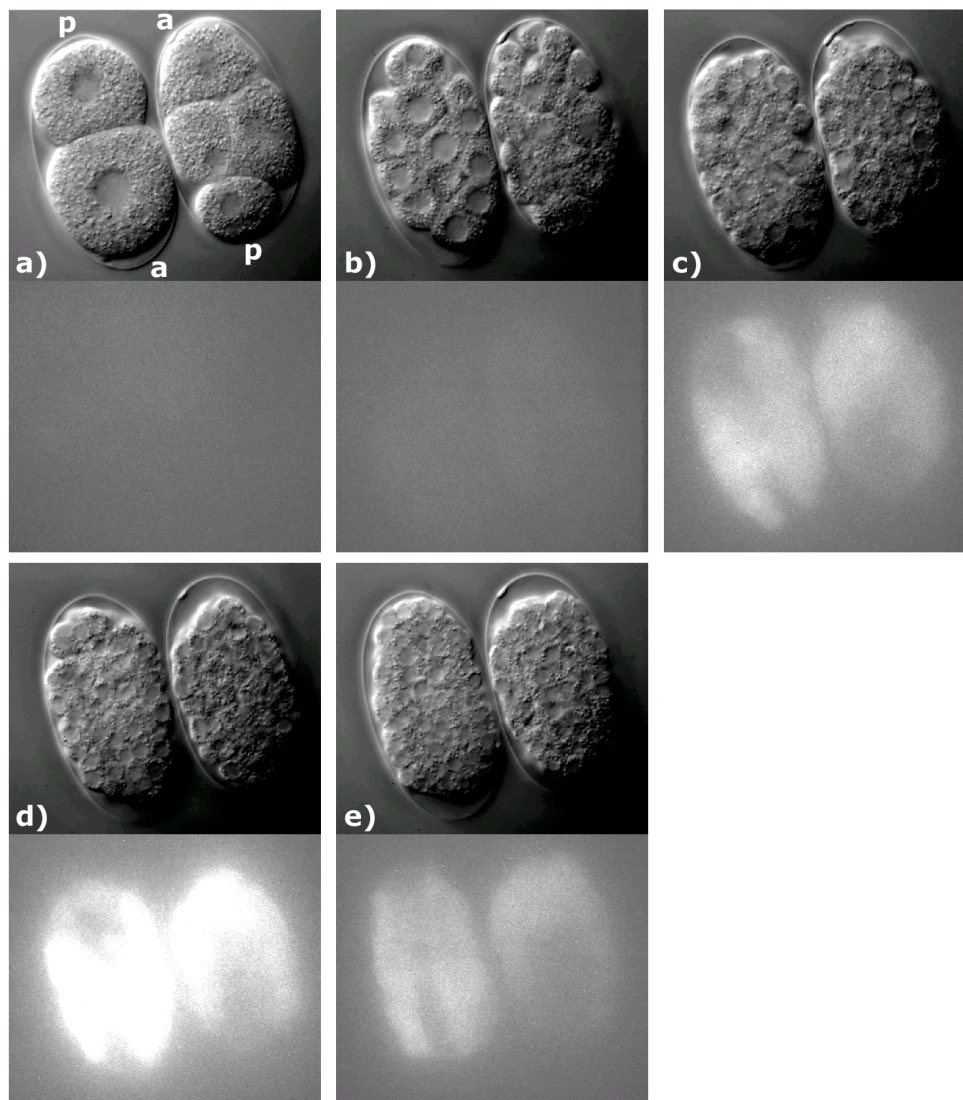


Abbildung 2.27: Zwei WT-Embryonen, die mit einem YFP-Expressionskonstrukt hinter dem *cib-3*-Promotor transformiert wurden. Im oberen Bild ist jeweils die Nomarski-Ansicht zu sehen, im unteren Bild die YFP-Expression. a) und b) In der frühen Embryonalentwicklung war keine YFP-Expression zu sehen. Anterior (a) und posterior (p) sind in a) gekennzeichnet. c) Die YFP-Expression begann etwa im 150-Zell-Stadium und nahm bis zum 400-Zell-Stadium in d) weiter zu. e) Zum prämorphogenetischen Stadium nahm die YFP-Expression wieder ab. Das Expressionsmuster war in beiden Embryonen verschieden, YFP war hauptsächlich in der AB-Zelllinie und in einzelnen Zellen der anderen Zelllinien wie z.B. in D im rechten Embryo zu sehen.

Ein CIB-3::GFP-Fusionsprotein lokalisiert in allen Zellen im Cytoplasma

Für die Funktion eines Proteins ist die richtige Lokalisierung in der richtigen Zelle essentiell. Die Lokalisierung von CIB-3 kann auch Hinweise auf die Funktion des Proteins liefern.

Um die Lokalisierung von CIB-3 nachzuweisen, wurde ein CIB-3::GFP-Fusionsprotein eingesetzt. Für das Fusionsprotein wurde der ORF für GFP vor das STOP-Codon des

ORF von CIB-3 auf einen entsprechenden Vektor kloniert (siehe Anhang 6.3, S. 159). Der ORF von CIB-3 liegt hinter dem *cib-3*-Promotor. Dieses Konstrukt wurde bereits zur Komplementation der Mutante *cib-3(e2280)* eingesetzt. Um auf das Array mit dem Fusionsprotein zu selektionieren, wurde das Konstrukt in die Mutante *cib-3(e2280)* transformiert. Wenn die Mutation komplementiert wird, muss auch das CIB-3::GFP-Fusionsprotein auf dem Array exprimiert werden.

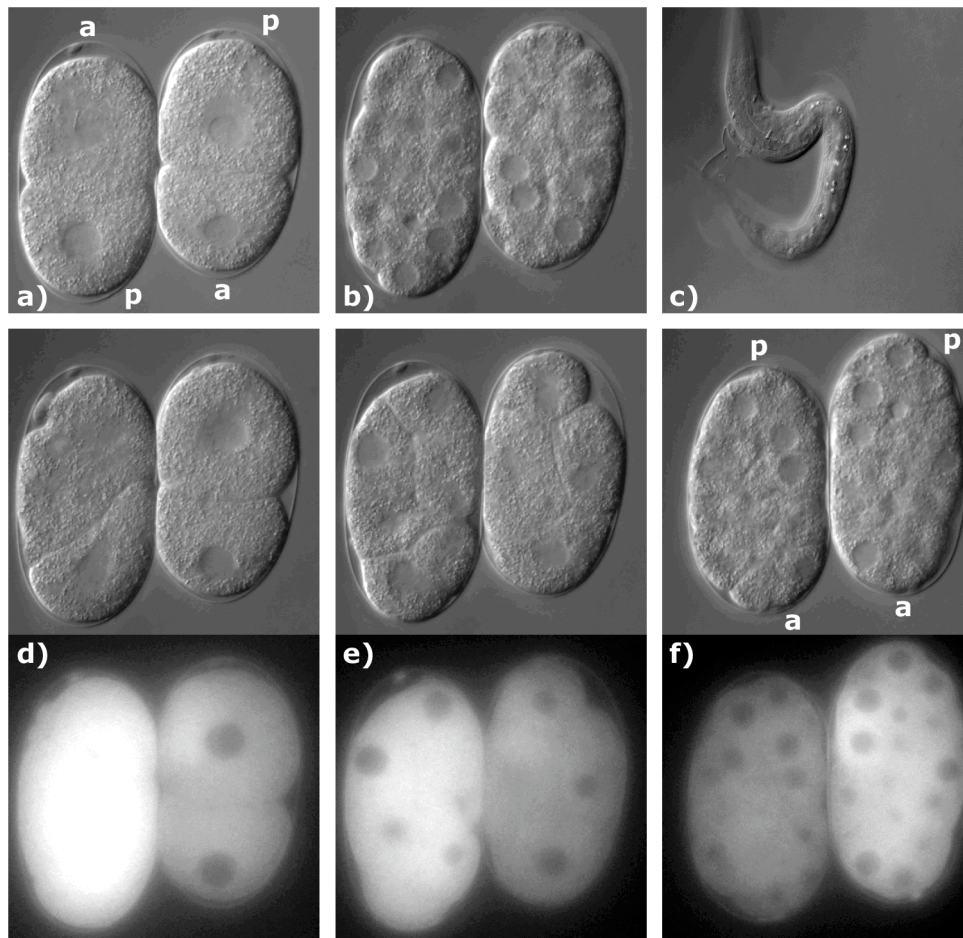


Abbildung 2.28: Zwei *cib-3(e2280)*-Embryonen bei 25°C mit einem komplementierenden CIB-3::GFP-Fusionskonstrukt. Die Embryonen entwickelten sich wie WT-Embryonen. a) – c) Nomarski-Ansichten zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung. a) Zwei 2-Zell-Stadien, anterior (a) und posterior (p) sind gekennzeichnet. b) Die Embryonen mit 80-Zellen. c) Die beiden Embryonen schlüpften, nur eine Larve war noch im Bild. d) – f) Zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung wurden Aufnahmen am 2-Kanal-4D-Mikroskop gemacht. Oben ist die Nomarski-Ansicht dargestellt, unten die Ansicht im Fluoreszenzkanal. d) und e) Die Intensität der GFP-Expression war in beiden Embryonen verschieden, sie war schon in den frühen Stadien der Entwicklung gut zu sehen. f) Um zu zeigen, dass dieser Intensitätsunterschied wirklich von den Embryonen und nicht durch Beleuchtungsartefakte verursacht ist, wurde das Präparat im 80-Zell-Stadium gedreht (in b) sind die Embryonen direkt vor der Drehung zu sehen), die Expression drehte sich mit.

Die komplementierenden Linien waren nur über wenige Generationen stabil. In allen Generationen starben sehr viele Embryonen, die Gelegegröße war reduziert und 10 % der Hermaphroditen waren steril. Wahrscheinlich ist die Regulation der Gene auf dem Array nach der Transformation sehr komplex, und die stabilen Linien sind sehr sensitiv gegenüber der Gendosis.

Die stabilen Linien wurden am 2-Kanal-4D-Mikroskop aufgenommen und ausgewertet (siehe Abbildung 2.28). Bei Komplementation der Mutation mit dem CIB-3::GFP-Fusionsprotein verlief die Entwicklung der Embryonen wie in WT-Embryonen, die Larven schlüpften unter dem Mikroskop. Die GFP-Expression begann bereits in den frühen Entwicklungsstadien und reichte bis zum 250-Zell-Stadium. Das Fusionsprotein war in allen Zellen im Cytoplasma lokalisiert, in den Zellkernen war keine Fluoreszenz zu sehen. Die Intensität der GFP-Expression war zwischen den Embryonen jedoch verschieden. Um auszuschließen, dass diese Intensitätsunterschiede durch Artefakte bei der Beleuchtung oder andere äußere Einflüsse verursacht wurden, wurde das Präparat im 80-Zell-Stadium gedreht. Die Expression drehte sich ebenfalls, die unterschiedliche Intensität stammte von den Embryonen. Da die GFP-Expression in den Embryonen sehr schwach war, wurde ein Vergleich mit WT-Embryonen durchgeführt. Der Vergleich sollte sicherstellen, dass in den Embryonen wirklich das CIB-3::GFP-Fusionsprotein zu sehen war.

***cib-3(e2280)*-Embryonen mit CIB-3::GFP fluoreszieren**

Das 2-Kanal-4D-Mikroskop ist so sensitiv, dass anscheinend auch WT-Embryonen bei langen Belichtungszeiten ohne jedes GFP-Konstrukt fluoreszieren. Die Expression des CIB-3::GFP-Fusionsproteins war nach der Komplementation von *cib-3(e2280)*-Embryonen sehr schwach. Diese schwache Expression konnte mit dem sensitiven Mikroskop auch ein Artefakt sein. Um diese Frage eindeutig zu klären, wurden *cib-3(e2280)*-Embryonen mit dem komplementierenden CIB-3::GFP-Fusionskonstrukt neben WT-Embryonen präpariert und aufgenommen. Die Auswertung zeigt eindeutig, dass die GFP-Expression in den mutanten Embryonen kein Artefakt war und auch in den frühen Stadien der Embryonalentwicklung das Fusionsprotein in allen Zellen im Cytoplasma lokalisierte (siehe Abbildung 2.29). Die Embryonen waren durch die mengenabhängige Expression des Fusionsproteins oft sehr krank. In diesem Beispiel

exprimierte der Embryo offenbar das Protein in falscher Menge. Es entstanden zusätzliche Zellkerne und ektopische Spindeln, der Embryo starb mit 150 Zellen. Diese Mengenabhängigkeit führte auch zum Aussterben der stabilen Linien nach mehreren Generationen.

Das CIB-3::GFP-Fusionsprotein wurde von einem Array exprimiert und das Überleben der komplementierten *cib-3(e2280)*-Embryonen war bei restriktiver Temperatur sehr stark mengenabhängig. Das Protein lokalisierte während der frühen Embryonalentwicklung bis zum 250-Zell-Stadium in allen Zellen im Cytoplasma. Eine genauere Lokalisation des Proteins in einem Zellkompartiment war nicht zu erkennen. Leider konnte durch Transformation kein Stamm hergestellt werden, bei dem das Fusionskonstrukt in das Genom integriert wurde. Ob dieses Expressionsmuster der endogenen Lokalisation des Proteins entspricht, konnte nicht eindeutig geklärt werden.

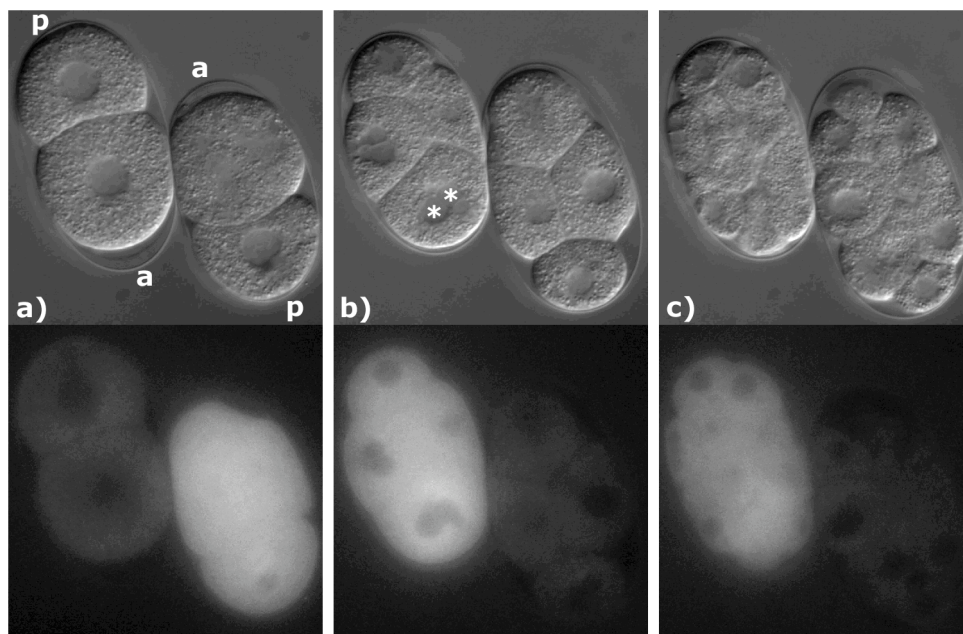


Abbildung 2.29: Zum Vergleich wurde ein WT-Embryo neben einem *cib-3(e2280)*-Embryo mit dem komplementierenden Fusionskonstrukt bei 25°C am 2-Kanal-4D-Mikroskop aufgenommen. Oben ist die Nomarski-Ansicht dargestellt, unten die Ansicht im Fluoreszenzkanal. Bei dieser Aufnahme starb der *cib-3*-Embryo. a) Die 2-Zell-Stadien waren nur an der Fluoreszenz zu unterscheiden, der linke Embryo war der WT-Embryo. Anterior (a) und posterior (p) sind gekennzeichnet. b) Das Präparat wurde im 4-Zell-Stadium gedreht, um Beleuchtungsartefakte auszuschließen. Im linken *cib-3*-Embryo waren trotz der Komplementation erste Defekte zu erkennen, in der ABa-Zelle sind zwei Zellkerne zu sehen (weiße Sterne). c) Die Expression nahm in späteren Stadien der Entwicklung ab.

Das Expressionsmuster des CIB-3::GFP-Fusionsproteins trägt ebenfalls nicht weiter zur Aufklärung der Proteinfunktion bei, da CIB-3 nicht in einem Zellkompartiment lokalisiert. Die Funktion wurde über andere Fluoreszenzkonstrukte weiter charakterisiert. So war es bisher eine offene Frage, welches Schicksal die Zellen nach der symmetrischen Teilung annehmen.

2.15 Proteine werden in Teilungen der P-Zellinie falsch segregiert

Ein charakteristisches Merkmal für den *cib-3*-Phänotyp sind symmetrische Teilungen der P2- oder P3-Zelle. In der Mutante *cib-3(e2280)* teilen sich die Zellen oft nicht weiter oder lassen sich keinem Teilungsmuster mehr zuordnen. Es stellt sich die Frage, ob die Zellen nach der symmetrischen Zellteilung ein somatisches oder ein P-Zell-Schicksal annehmen. Für beide Schicksale sind spezifische Faktoren bekannt, die bei einer Teilung in der P-Zellinie asymmetrisch in eine der beiden Tochterzellen segregiert werden (Mello *et al.*, 1996). Zunächst wurde der Einfluss von CIB-3 auf die Verteilung des P-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktors PIE-1 untersucht und danach der Einfluss auf das somatische Protein MEX-5.

PIE-1 als spezifischer Transkriptionsfaktor wird in der P1-Zelle falsch verteilt

Das Gen *pie-1* (*pharynx and intestine in excess*) codiert für einen Transkriptionsfaktor mit einer CCCH-Zinkfinger-Domäne. Das maternale Protein ist essentiell für die Entwicklung der Keimbahn, da der Transkriptionsfaktor die Genexpression in der P-Zellinie und den Oozyten durch eine Interaktion mit einer Untereinheit der RNA-Polymerase II reprimiert (Seydoux und Dunn, 1997). Das Protein wurde als PIE-1::GFP-Fusionsprotein bereits in den Oozyten nachgewiesen (Büssing, 2005) und wird embryonal immer in die P-Zellinie segregiert (siehe Abbildung 2.30 und Reese *et al.*, 2000). In der Zygote wird das Protein mit der fortschreitenden Polarisierung (siehe Kapitel 1.2, S. 7 und 2.17, S. 81) im posterioren Cytoplasma lokalisiert. Der größte Teil von PIE-1 wird in die P1-Zelle segregiert, nur ein Rest bleibt in der somatischen AB-Zelle und wird dort degradiert. In der P1-Zelle wird PIE-1 in den Zellkern transportiert und reprimiert dort die Genexpression. Eine geringe Menge des Proteins bleibt im Cytoplasma. Außerdem bindet der Transkriptionsfaktor an die Keimbahn-spezifischen P-Granulae und während der Mitose vor allem an die posteriore Spindel. In den

folgenden Mitosen wird PIE-1 wieder in die nächste P-Zelle segregiert bis in Z2 und Z3. Die asymmetrische Segregation des Proteins ist wie die Polarisierung der Zygote abhängig von den PAR-Proteinen, die später noch vorgestellt werden (siehe Kapitel 2.17, S. 81).

Mutanten in dem Gen *pie-1* bilden zusätzliche Pharynx- und Darmzellen (Mello *et al.*, 1992). Die zusätzlichen Zellen entwickeln sich aus den P-Zellen, in denen die Menge an PIE-1 reduziert ist. In diesen P-Zellen wird die Transkription nicht mehr reprimiert und stattdessen werden Gene für die Entwicklung in somatische Zellen transkribiert. Die Menge des Proteins PIE-1 ist daher ein guter Indikator für das P-Zell-Schicksal.

Um das Schicksal der Zellen nach einer symmetrischen Teilung in *cib-3(e2280)*-Embryonen zu klären, wurde die Mutante mit dem Stamm JH1327 gekreuzt, der ein PIE-1::GFP-Fusionsprotein exprimiert. Das Expressionskonstrukt wurde in dem Labor von Geraldine Seydoux hergestellt. Der ORF für GFP ist vor dem STOP-Codon des ORF für PIE-1 inseriert und beide liegen hinter dem *pie-1*-Promotor. Das Konstrukt trägt den dominanten Selektionsmarker pRF4 (transgene Würmer rollen entlang der Längsachse um sich selbst) und ist ins Genom integriert. Bei den Kreuzungen von JH1327 mit der Mutante *cib-3(e2280)* gab es keine Nachkommen der F2-Generation, die *cib-3(e2280)* und das Expressionskonstrukt im genetischen Hintergrund hatten. Um den Einfluss von CIB-3 auf PIE-1::GFP trotzdem zu untersuchen, wurde *cib-3*-dsRNA in den Stamm JH1327 injiziert (siehe Kapitel 4.4, S. 126). Der roller-Phänotyp erschwerte die Injektion der Würmer extrem, da die Struktur der Cuticula verändert war. Die Hypodermis der Hermaphroditen ließ sich auf die doppelte Breite ziehen und fast nicht mit einer Injektionsnadel durchstoßen. Außerdem hatten die Hermaphroditen Probleme bei der Eiablage und es wurden insgesamt weniger Eier produziert.

Die embryonal letalen Embryonen wurden ab 20 h nach der Injektion (siehe *cib-3*-RNAi in 2.10, S. 52) bei 25°C am 4D-Mikroskop aufgenommen und das Expressionsmuster mit dem Ausgangsstamm verglichen (siehe Abbildung 2.30). In der Zygote und der P1-Zelle lokalisierte PIE-1::GFP in den RNAi-Embryonen wie in dem Kontrollstamm. Danach wurde das Fusionsprotein jedoch nicht mehr richtig segregiert, sondern war in der P2-Zelle und in der EMS-Zelle im Zellkern und im Cytoplasma zu sehen.

Diese Fehlverteilung fand sowohl bei symmetrischen als auch bei asymmetrischen Zellteilungen und in allen weiteren Teilungen der P-Zelllinie statt.

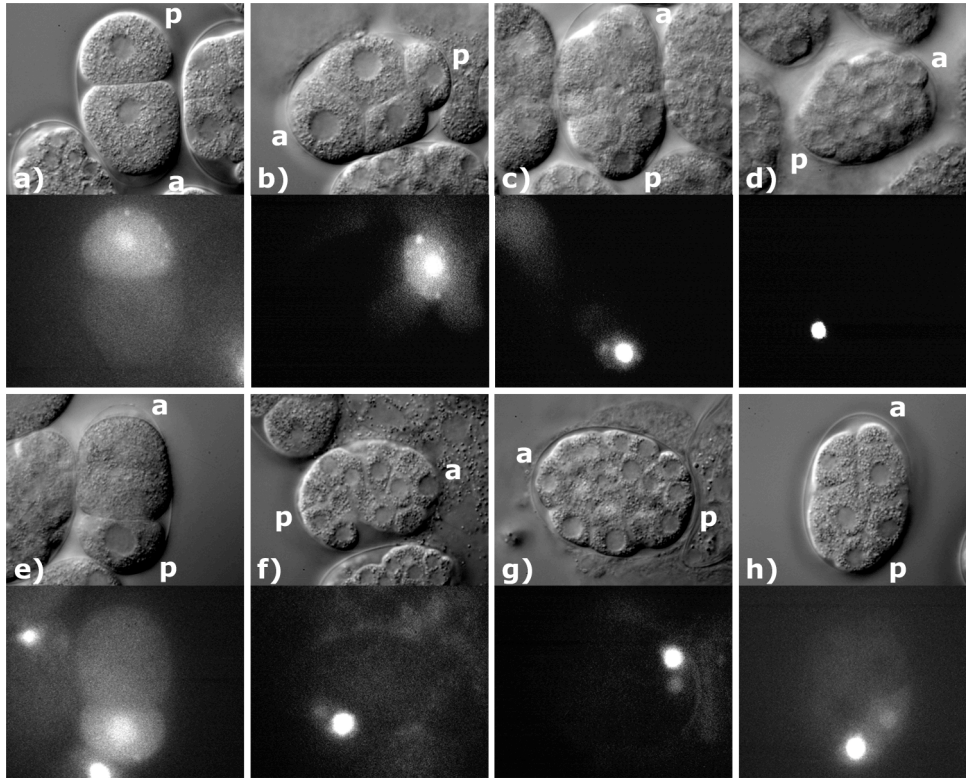


Abbildung 2.30: WT-Embryonen und Embryonen mit *cib-3*-RNAi bei 25°C mit einem PIE-1::GFP-Expressionskonstrukt (Reese *et al.*, 2000). Oben ist die Nomarski-Ansicht dargestellt, unten die Ansicht im Fluoreszenzkanal. a) – d) WT-Embryonen in verschiedenen Stadien, das GFP-Fusionsprotein lokalisierte immer in der Keimbahn. a) Im 2-Zell-Embryo war PIE-1::GFP in der P1-Zelle im Zellkern, an den P-Granulae und schwächer im Cytoplasma lokalisiert. b) Im 4-Zell-Embryo war PIE-1::GFP in der P2-Zelle zu sehen. c) PIE-1::GFP in der P3-Zelle. d) PIE-1::GFP in der P4-Zelle. Das GFP-Konstrukt war auch in den beiden Zellkernen von Z2 und Z3 zu sehen (hier nicht dargestellt). e) – h) Embryonen mit *cib-3*-RNAi in verschiedenen Stadien. e) Im 2-Zell-Stadium wurde PIE-1::GFP wie im WT-Embryo lokalisiert. In den späteren Teilungen der P-Zelllinie wurde PIE-1::GFP jedoch auf zwei Zellen verteilt. In f) und g) ist PIE-1::GFP nach einer symmetrischen Teilung in den Zellen C und P3 zu sehen. h) Nach der asymmetrischen Teilung der P1-Zelle ist PIE-1::GFP in P2 und EMS zu sehen. Anterior (a) und posterior (p) sind in allen Bildern gekennzeichnet.

Nach *cib-3*-RNAi ist PIE-1::GFP in den somatischen Zellen EMS, C und D im Zellkern nachweisbar und reprimiert dort die Genexpression wie in der P-Zelllinie. Das Schicksal dieser somatischen Zellen ist im Vergleich mit WT-Embryonen verändert. In den P-Zellen lokalisiert PIE-1::GFP aber normal. Ob die Schicksalsänderung der EMS-Zelle auch die Segregation von somatischen Proteinen verändert, wurde an dem Beispiel MEX-5 geprüft.

MEX-5 wird ebenfalls ab der P1-Zell-Teilung falsch segregiert

Das Gen *mex-5* (*muscle excess*) codiert für ein cytoplasmatisches Protein mit zwei CCCH-Zinkfinger-Domänen (Cuenca *et al.*, 2003; Schubert *et al.*, 2000). Die Funktion des Proteins ist nicht eindeutig geklärt, aber es ist zusammen mit MEX-6 essentiell für die Etablierung der Asymmetrie zwischen Soma und Keimbahn. Bei einer Überexpression von MEX-5 werden keimbahnspezifische Proteine wie PIE-1 degradiert. In Mutanten in dem Gen *mex-5* werden die keimbahnspezifischen Proteine dagegen aktiviert. Das Protein MEX-5 wird abhängig von der Zellpolarität und den PAR-Proteinen in die somatischen Zellen segregiert (siehe 2.17, S. 81). In der Zygote lokalisiert ein MEX-5::GFP-Fusionsprotein mit der fortschreitenden Polarisierung anterior und wird hauptsächlich in die somatische AB-Zelle transportiert (siehe Abbildung 2.31 und Cuenca *et al.*, 2003). In der weiteren Embryonalentwicklung ist MEX-5 in den somatischen Blastomeren EMS, C und D nachweisbar. Das Protein ist essentiell für die Entwicklung der somatischen Zellschicksale und wurde deshalb im Zusammenhang mit CIB-3 untersucht.

In *cib-3(e2280)*-Embryonen wurde der P-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor PIE-1 bereits ab dem 2-Zell-Stadium falsch verteilt. Diese Fehlverteilung sollte einen Einfluss auf das Schicksal der Tochterzellen haben, da PIE-1 die somatische Genexpression reprimiert. Das somatische Protein MEX-5 sollte in diesen Zellen ebenfalls reprimiert werden. Um diese Hypothese zu testen, wurde der Stamm JH1448 aus dem Labor von Geraldine Seydoux benutzt, in dem ein MEX-5::GFP-Fusionsprotein exprimiert wird. Der Stamm trägt ein extrachromosomales Array mit einem Vektor, auf dem der ORF für MEX-5 hinter dem *pie-1*-Promotor liegt. Der ORF für GFP wurde vor dem STOP-Codon von *mex-5* inseriert. Der Vektor trägt zur Selektion das dominante pRF4. Der Stamm JH1448 wurde mit der Mutante *cib-3(e2280)* gekreuzt, aber es gab keine Nachkommen mit dem Fusionskonstrukt und der Mutation.

Da CIB-3 MEX-5 beeinflusste, wurde zusätzlich *cib-3*-dsRNA in JH1448 injiziert. Da die Durchführung der Injektion durch den roller-Phänotyp wie bei PIE-1::GFP sehr schwierig war, wurde das RNAi-Experiment von *cib-3* mit der Fütterungsmethode durchgeführt (siehe *cib-3*-RNAi in Kapitel 2.10, S. 52). Die maternal letalen Embryonen wurden bei 25°C am 4D-Mikroskop aufgenommen. In der Zygote und im 2-Zell-

Stadium wurde MEX-5::GFP wie im Kontrollstamm lokalisiert, aber danach war das Fusionsprotein auch in den P-Zellen zu sehen (siehe Abbildung 2.31). In P2 und P3 war ein schwaches MEX-5::GFP-Signal erkennbar. In dem dargestellten Embryo teilte sich die P3-Zelle symmetrisch. Genau wie bei der Lokalisation von PIE-1::GFP wurde MEX-5::GFP sowohl bei symmetrischen als auch bei asymmetrischen Zellteilungen falsch segregiert.

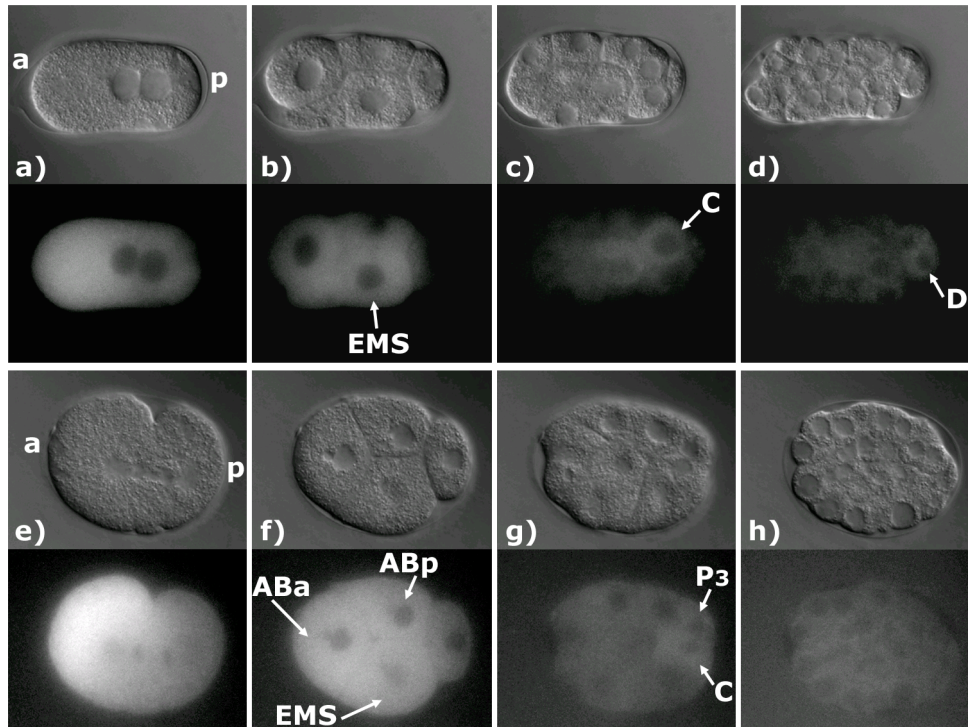


Abbildung 2.31: WT-Embryonen und Embryonen mit *cib-3*-RNAi bei 25°C mit einem MEX-5::GFP-Expressionskonstrukt (Cuenca *et al.*, 2003). Oben ist die Nomarski-Ansicht dargestellt, unten die Ansicht im Fluoreszenzkanal. a) – d) WT-Embryonen in verschiedenen Stadien, das MEX-5::GFP wurde in die somatischen Tochterzellen segregiert. a) In der Zygote war MEX-5::GFP bereits anterior lokalisiert. b) Im 4-Zell-Embryo war MEX-5::GFP in den beiden Zellen ABA und ABp und in der EMS-Zelle zu sehen. c) Das GFP-Fusionsprotein lokalisierte in der C-Zelle und schwächer in den Zellen MS und E. d) MEX-5::GFP war in der D-Zelle zu sehen. e) – h) Embryonen mit *cib-3*-RNAi in verschiedenen Stadien, die Bilder wurden doppelt so lang belichtet wie bei den WT-Embryonen. e) Zu Beginn der Embryonalentwicklung war bei der Lokalisation von MEX-5::GFP kein Unterschied zu WT-Embryonen zu erkennen. f) Das Fusionsprotein war in allen vier Zellen zu erkennen, in der P-Zelle war die Intensität etwas geringer. g) Nach der nächsten Zellteilung war MEX-5::GFP auch in der P3-Zelle zu sehen. Die P3-Zelle teilte sich symmetrisch. h) Nach der symmetrischen Zellteilung war keine GFP-Expression mehr feststellbar. Anterior (a) und posterior (p) sind in a) und e) gekennzeichnet.

In den P-Zellen und ihren somatischen Schwesterzellen wird ab dem 4-Zell-Stadium ohne CIB-3 die Genexpression durch PIE-1 reprimiert und gleichzeitig werden Keimbahn-spezifische Proteine durch MEX-5 degradiert. Das Schicksal der Zellen wird

durch die beiden Proteine MEX-5 und PIE-1 gesteuert. Bisher ist keine Situation bekannt, in der beide Proteine in diesen Mengen in P-Zellen und somatischen Zellen vorkommen. Für die Verteilung der Proteine wird in der Diskussion (siehe Kapitel 3.2, S. 106) ein Mechanismus postuliert.

Die beiden Proteine wurden bereits im 4-Zell-Stadium falsch segregiert. Im 2-Zell-Stadium ist kein Unterschied zu der Verteilung der Proteine in WT-Embryonen zu sehen. Der Defekt muss also während der Mitosen im 2-Zell-Stadium auftreten. Ein wichtiger Prozess vor der Mitose in der P1-Zelle ist die Drehung der Spindel.

Um die Funktion von CIB-3 zeitlich einzugrenzen, wurde die Drehung der Spindel in *cib-3(e2280)*-Embryonen analysiert.

2.16 Die Spindel in der P1-Zelle dreht sich normal

Die verschiedenen Prozesse in der P1-Zelle sind zeitlich genau aufeinander abgestimmt. In WT-Embryonen beginnt direkt nach der Zellteilung der Zygote die Polarisierung des Zellcortexes in P1. Die beteiligten PAR-Proteine werden im nächsten Kapitel genauer vorgestellt (siehe 2.17, S. 81). Nach der Bildung des Zellkerns wird das Centrosom dupliziert. Die beiden Centrosomen wandern nach der Polarisierung des Cortexes auf gegenüberliegende Seiten des Zellkerns (Hyman und White, 1987). Durch einen Mikrotubuli-abhängigen Mechanismus wird ein Centrosom nach anterior gezogen und das zweite bleibt immer gegenüber. Welches Centrosom nach vorne gezogen wird, hängt von dem Abstand der Centrosomen zu der Stelle ab, an der bei der Zellteilung die letzte Verbindung zwischen der AB-Zelle und P1 bestand (Basham und Rose, 1999; Pichler *et al.*, 2000). An dieser Stelle bleibt ein Proteinkomplex bestehen und die an den Komplex gebundenen Mikrotubuli ziehen das nächstliegende Centrosom nach anterior. Durch diesen Prozess kommt es zu einer Drehung der Spindel um 90° in der P1-Zelle vor der Mitose. Die Zellteilung erfolgt nach der Drehung entlang der anterior-posterioren Körperachse des Embryos (siehe Abbildung 2.32). Die Teilung der AB-Zelle erfolgt ohne Drehung der Spindel, so dass das typische 4-Zell-Stadium entsteht. Vor der nächsten Zellteilung der P2-Zelle wird die Spindel auch nicht gedreht, so dass sich die Zelle im 90°-Winkel zur a-p-Achse teilt. Die Drehung der Spindel ist also ein zeitlich genau koordinierter Mechanismus, der spezifisch in der P1-Zelle stattfindet. Die

Proteine PIE-1 und MEX-5 werden nach der Spindeldrehung während der Zellteilung segregiert.

In Embryonen mit *cib-3*-RNAi wurden die Proteine PIE-1 und MEX-5 während der Zellteilung der P1-Zelle falsch verteilt, sie waren in den beiden Tochterzellen EMS und P2 nachweisbar. Die Spindeldrehung erfolgt in der P1-Zelle direkt vor der Zellteilung und kann möglicherweise auch von CIB-3 beeinflusst werden. Unter diesem Aspekt wurden alle Aufnahmen von Embryonen mit *cib-3*-RNAi und von *cib-3(e2280)*-Embryonen nochmal ausgewertet. Die Spindel drehte sich in allen analysierten P1-Zellen wie in WT-Embryonen, der Prozess wurde nicht verändert. Das 4-Zell-Stadium wurde, bis auf die Verteilung der Proteine PIE-1 und MEX-5, normal gebildet. Bei manchen *cib-3*-Embryonen wurde allerdings die Spindel in der P2-Zelle nicht richtig positioniert. Über den Prozess der Spindelpositionierung in dieser Zelle ist allerdings fast nichts bekannt, die Spindel wird auf jeden Fall anders als in der P1-Zelle positioniert (Gönczy, 2005). Ob die Spindel in der P2-Zelle in *cib-3*-Embryonen direkt durch CIB-3 oder durch die falsche Verteilung der anderen Proteine wie PIE-1 und MEX-5 positioniert wird, wurde nicht weiter untersucht.

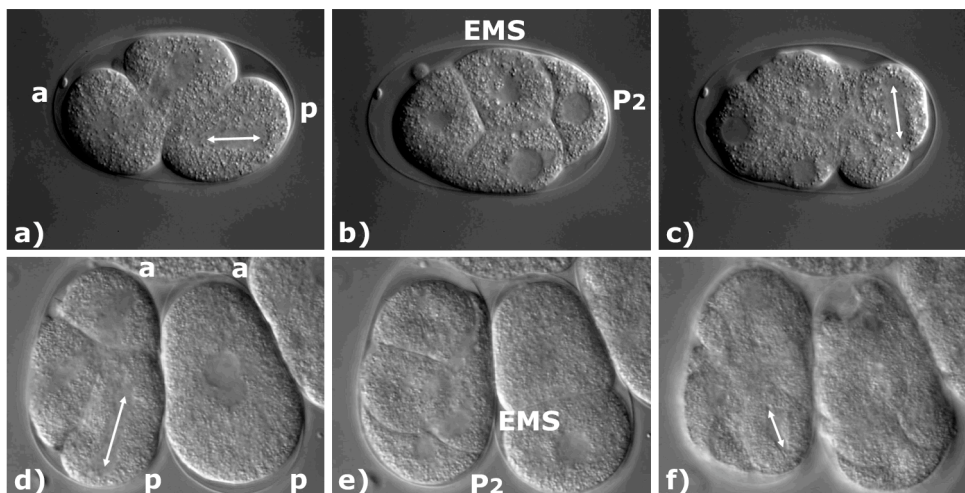


Abbildung 2.32: Die Drehung der Spindel in der P1- und in der P2-Zelle in einem WT-Embryo und einem *cib-3(e2280)*-Embryo. a) – c) WT-Embryo. a) In der P1-Zelle war die Spindel (weißer Pfeil) entlang der anterior-posterioren Achse des Embryos zu sehen. b) 4-Zell-Stadium. c) Die Spindel in der P2-Zelle (weißer Pfeil) war im 90°-Winkel zur a-p-Achse zu sehen. d) – f) *cib-3(e2280)*-Embryos. d) Im linken Embryo war die Spindel in der P1-Zelle genau wie im WT-Embryo entlang der a-p-Achse zu sehen. e) 4-Zell-Embryo. f) Die Spindel in der P2-Zelle war nicht um 90° gedreht. Anterior (a) und posterior (p) sind in a) und d) gekennzeichnet.

Die Funktion von CIB-3 wurde nach Vergleichen der Spindelpositionen in WT-Embryonen und in *cib-3*-Embryonen zeitlich besser eingegrenzt. Die Spindel wurde in der P1-Zelle ganz normal gedreht. CIB-3 beeinflusste erst danach die Segregation der Proteine PIE-1 und MEX-5 während der Zellteilung. Die Verteilung der beiden Proteine ist abhängig von der Polarisierung des Zellcortexes und den PAR-Proteinen (Gönczy, 2005; Kemphues *et al.*, 1988; Munro *et al.*, 2004), die im nächsten Kapitel vorgestellt werden.

2.17 Keine corticale Polarität nach symmetrischen Teilungen

Die Polarisierung der Zygote und die asymmetrische Verteilung von Proteinen wie PIE-1 und MEX-5 ist wie zuvor erwähnt (siehe Kapitel 1.2, S. 7 oder 2.15, S. 74) von den PAR-Proteinen (*abnormal embryonic partitioning of cytoplasm*). Mutanten in den PAR-Genen gehören zu den ersten beschriebenen maternal letalen Mutanten in *C. elegans* (Kemphues *et al.*, 1986). In allen Mutanten ist die Polarisierung der Zygote nach dem Eintritt des paternalen Vorkerns defekt. Besonders auffällig sind Fehler bei der ersten Zellteilung, auch die Zellschicksale sind verändert. Die anterior-posteriore Körperachse wird in WT-Embryonen durch die Rekrutierung der PAR-Proteine aus dem Cytoplasma an den Zellcortex der Zygote etabliert. Der Zellcortex ist ein Bereich unmittelbar unterhalb der Zellmembran. Am anterioren Pol bindet ein Proteinkomplex aus PAR-3, PAR-6 und PKC-3, am posterioren Pol PAR-1 und PAR-2. Die anterioren und posterioren PAR-Proteine verdrängen sich gegenseitig aus den jeweiligen Bereichen am Zellcortex. In der folgenden Zellteilung werden die anterioren Proteine in die somatische AB-Blastomere segregiert, die posterioren in die P-Zelllinie (Kemphues, 2000; Rose und Kemphues, 1998). Um in dieser Arbeit die Funktion des Proteins CIB-3 zu identifizieren, wurde erst der Einfluss von CIB-3 auf das P-Zell-spezifische PAR-2 untersucht und danach der Einfluss auf das anteriore PAR-6.

PAR-2::GFP lokalisiert nach symmetrischer Teilung nicht am posterioren Cortex

Das Gen *par-2* codiert für ein Protein mit RING-Finger-Domäne. Diese Domäne ist aus E3-Ubiquitin-Ligasen bekannt, die meist zum Ubiquitin-vermittelten Abbau von Proteinen beitragen. Die genaue biochemische Funktion von PAR-2 ist bisher jedoch nicht geklärt. Aus Mutantenanalysen ist bekannt, dass PAR-2 für die Etablierung des

posterioren Pols in der Zygote essentiell ist. Die Lokalisierung des Proteins ist neben seiner Wirkung auf die erste Zellteilung in verschiedenen Laboren intensiv untersucht worden (Cuenca *et al.*, 2003; Kemphues *et al.*, 1988; Wallenfang und Seydoux, 2000). In der Zygote ist PAR-2 zunächst im Cytoplasma lokalisiert und wird mit der fortschreitenden Polarisierung an den posterioren Cortex rekrutiert (siehe Abbildung 2.33). Das Protein markiert am Ende der Polarisierung den Bereich des Zellcortexes, der in der nächsten Zellteilung die P1-Zelle bilden wird. In den weiteren Zellteilungen ist die Lokalisierung des PAR-2-Proteins dynamisch. Zu Beginn des Zellzyklus ist das Protein um den gesamten Cortex verteilt. Das Protein wird bis zur nächsten Zellteilung immer in den Bereich des Cortexes zurückgezogen, der die nächste P-Zelle bilden wird. PAR-2 lokalisiert in gleicher Weise in allen P-Zellen am Cortex. Ab dem 4-Zell-Stadium ist es außerdem an den Zell-Zell-Kontakten und am Cortex der somatischen Blastomeren EMS, C und D nachweisbar. Außer der Funktion von PAR-2 bei der Polarisierung des posterioren Pols in der Zygote ist über die Funktion des Proteins nichts bekannt. Von der Polarisierung durch PAR-2 ist die Verteilung verschiedener Proteine wie PIE-1 und MEX-5 bei der Zellteilung abhängig.

In *cib-3*-Embryonen wurden PIE-1 und MEX-5 ab der Teilung der P1-Zelle falsch segregiert. Es wurde untersucht, ob die Polarisierung der Zellen durch PAR-2 von CIB-3 abhängig ist. Für die Experimente in dieser Arbeit stand der Stamm KK866 aus dem Labor von Kenneth Kemphues zur Verfügung, der ein PAR-2::GFP-Fusionsprotein exprimiert. Der PAR-2::GFP-Vektor ist konstruiert wie die Vektoren für PIE-1::GFP und MEX-5::GFP (siehe Kapitel 2.15, S. 74). Der ORF für PAR-2 liegt hinter dem PIE-1-Promotor und wurde vor dem Stop-Codon mit dem ORF für GFP fusioniert. Das Konstrukt trägt als dominanten Selektionsmarker pRF4.

Nach der Fütterung von *cib-3*-dsRNA wurden die maternal letalen Embryonen am 4D-Mikroskop aufgenommen und das Expressionsmuster mit dem Ausgangsstamm verglichen (siehe Abbildung 2.33). In allen untersuchten Embryonen war die Expression des Fusionsproteins viel schwächer als ohne *cib-3*-RNAi. In der Zygote und im 2-Zell-Stadium lokalisierte PAR-2::GFP normal. Im 4-Zell-Stadium war die GFP-Expression so schwach, dass das Protein an den Zell-Zell-Kontakten nicht mehr zu detektieren war. PAR-2::GFP lokalisierte in der P2-Zelle wie im Kontrollstamm. In dem

dargestellten Embryo teilte sich die P₂-Zelle symmetrisch, danach war keine Expression von PAR-2::GFP mehr zu sehen.

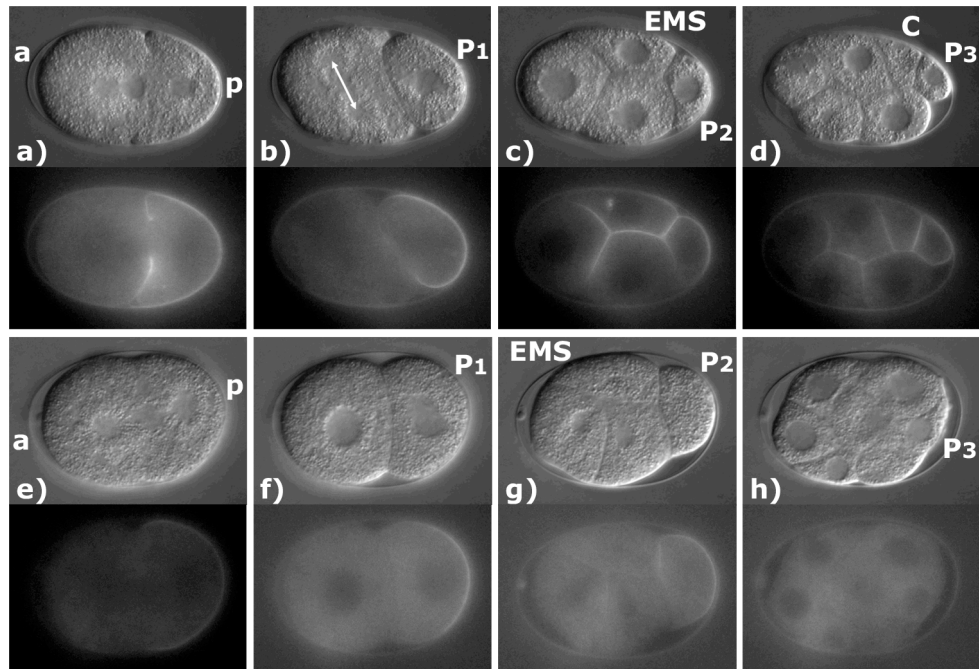


Abbildung 2.33: PAR-2::GFP in WT-Embryonen und in Embryonen mit *cib-3*-RNAi. a) – d) Die WT-Embryonen exprimierten ein PAR-2::GFP-Fusionsprotein (Wallenfang und Seydoux, 2000). Oben ist die Nomarski-Ansicht dargestellt, unten die Ansicht im Fluoreszenzkanal. a) In der Zygote lokalisierte das Protein am Zellcortex direkt unterhalb der Zellmembran um die spätere P₁-Zelle. b) In der P₁-Zelle lokalisierte PAR-2::GFP am posterioren Zellcortex und zog sich an der Position der nächsten P-Zelle zusammen. Die AB-Zelle teilte sich gerade (weißer Pfeil). c) Im 4-Zell-Stadium waren alle Zell-Zell-Kontakte GFP-positiv. Rund um die P₂-Zelle war PAR-2::GFP zu sehen, die EMS-Zelle exprimierte am Cortex ebenfalls sehr schwach GFP. d) An den Zell-Zell-Kontakten war immer schwächer PAR-2::GFP zu sehen, aber das Fusionsprotein lokalisierte rund um die P₃-Zelle. PAR-2::GFP war auch um die P₄-Zelle zu sehen (hier nicht dargestellt). e) – h) Embryonen mit dem PAR-2::GFP-Fusionsprotein und *cib-3*-RNAi. e) Die Expression des Fusionsproteins war in allen untersuchten *cib-3*-RNAi-Embryonen viel schwächer als im Ausgangsstamm. PAR-2::GFP lokalisierte aber normal am posterioren Zellcortex der Zygote. Die Bilder f) – h) wurden doppelt so lange belichtet wie die übrigen, um die GFP-Expression zu detektieren. f) Im 2-Zell-Stadium war die Lokalisierung des Fusionsproteins unverändert. g) Im 4-Zell-Stadium war die Expression so schwach, dass die Lokalisierung an den Zell-Zell-Kontakten nicht mehr zu sehen war. In der P₂-Zelle war PAR-2::GFP am Cortex rund um die nächste P-Zelle sichtbar. In diesem Embryo teilte sich die P₂-Zelle symmetrisch, danach war keine Expression von PAR-2::GFP mehr nachweisbar (h). Anterior (a) und posterior (p) sind in a) und e) gekennzeichnet.

Die Polarisierung der Zygote und der P₁-Zelle durch PAR-2 ist auch in *cib-3*-RNAi-Embryonen normal. Das Protein wird lediglich schwächer exprimiert, es lokalisiert aber richtig am Zellcortex. Während der Teilung der P₁-Zelle werden Proteine wie PIE-1 und MEX-5 falsch verteilt. Die Tochterzelle P₂ wird trotzdem richtig polarisiert. Erst nach einer symmetrischen Zellteilung ist PAR-2 nicht mehr am Zellcortex lokalisiert. CIB-3

hat also keinen Einfluss auf die Lokalisierung von PAR-2 in der P1-Zelle. Zur Sicherheit wurde auch der Einfluss von CIB-3 auf das anteriore Protein PAR-6 geprüft.

PAR-6::GFP lokalisiert vor symmetrischer Teilung am anterioren Cortex normal

Der anteriore Pol der Zygote wird durch einen Proteinkomplex aus PAR-3, PAR-6 und PKC-3 gebildet. Die Proteine sind bis zur Befruchtung im Cytoplasma verteilt. Durch die Bindung des paternalen Pronukleus an den posterioren Cortex wird an der Zellmembran eine Aktin-abhängige Bewegung ausgelöst (das sog. *ruffling*, Hird und White, 1993). Während des *Ruffling* werden die PAR-Proteine aus dem Cytoplasma rekrutiert. Durch die Bindung von PAR-2 an den posterioren Cortex stoppen in diesem Bereich die Membranbewegungen. Im anterioren Bereich bindet der Proteinkomplex aus PAR-3, PAR-6 und PKC-3 während der Membranbewegungen an den Cortex. Das Ruffling stoppt im anterioren Bereich erst, wenn die Polarisierung der Zygote abgeschlossen ist und die Vorkerne sich treffen.

Das Gen *par-3* codiert für ein Protein mit einer PDZ-Domäne und ist ein Homolog zu Proteinen wie Bazooka aus *Drosophila* (Cuenca *et al.*, 2003). Wie auch in anderen Organismen interagiert PAR-3 mit der konservierten atypischen Proteinkinase C PKC-3. Das Gen *par-6* ist in der Evolution ebenfalls bis zum Menschen konserviert und codiert für ein Protein mit PDZ-Domäne. PDZ-Domänen sind Protein-Protein-Interaktionsdomänen. Alle drei Proteine sind essentiell für die Polarisierung der Zygote in *C. elegans*. In *par*-Mutanten ist dieser Prozess gestört und die erste Zellteilung ist defekt (Kemphues *et al.*, 1988). Die Lokalisierung der Proteine ist voneinander abhängig und beeinflusst die Bindung von PAR-2 an den posterioren Cortex (Gönczy, 2005; Kemphues, 2000). PAR-2 verhindert die Bindung der anterioren PAR-Proteine am posterioren Cortex.

In der Zygote bindet der Proteinkomplex aus PAR-3, PAR-6 und PKC-3 an den anterioren Cortex. Nach der ersten Teilung lokalisiert der Komplex rund um die somatische AB-Blastomere und am Zell-Zell-Kontakt zwischen der AB- und der P1-Zelle. Ab dem 4-Zell-Stadium ist der Komplex um die somatischen Blastomeren und an den Zell-Zell-Kontakten nachweisbar. Die Proteine sind nicht nur in der Zygote an der Polarisierung beteiligt. Sie spielen auch eine wichtige Rolle für die Zellpolarität in den nächsten Zellteilungen und bilden eine apikale Proteinkappe. Für die Experimente in

dieser Arbeit wurde der Stamm JH1512 aus dem Labor von Geraldine Seydoux verwendet, der ein PAR-6::GFP-Fusionsprotein exprimiert (Cuenca *et al.*, 2003). Das Konstrukt wurde auf der Grundlage des gleichen Expressionsvektors wie PIE-1::GFP und MEX-5::GFP aufgebaut. Der ORF für PAR-6 liegt hinter dem *pie-1*-Promotor und wurde vor dem Stop-Codon mit dem ORF für GFP fusioniert. Das Konstrukt eignete sich gut, um die Lokalisierung des Proteins bis zum 4-Zell-Stadium zu verfolgen, danach wurde die GFP-Expression schwächer und war nicht eindeutig vom Hintergrundsignal zu unterscheiden (siehe Abbildung 2.34).

Die Proteine PIE-1 und MEX-5 werden in *cib-3*-Embryonen ab der Teilung der P1-Zelle nicht mehr richtig verteilt. Die Segregation dieser Proteine hängt in WT-Embryonen von der Polarisierung der Zelle durch die PAR-Proteine ab (Kemphues, 2000). PAR-2 ist posterior lokalisiert und beeinflusst die Segregation beider Proteine und der P-Granulae. Der anteriore Proteinkomplex mit PAR-6 interagiert mit dem Protein MEX-5 und vermittelt bei der Zellteilung die Segregation in die somatischen Tochterzellen. Um einen Einfluss von CIB-3 auf den anterioren PAR-Komplex mit PAR-6 zu finden, wurde *cib-3*-dsRNA in den *C. elegans*-Stamm JH1512 mit einem PAR-6::GFP-Konstrukt gefüttert.

Nach der Fütterung wurden maternal letale Embryonen am 2-Kanal-4D-Mikroskop aufgenommen und mit dem Kontrollstamm verglichen (siehe Abbildung 2.34). Bis zum 4-Zell-Stadium war die Lokalisierung von PAR-6::GFP am Zellcortex und an den Zell-Zell-Kontakten unverändert. Danach ließ sich das Fusionsprotein nicht mehr eindeutig nachweisen. Das Protein CIB-3 hat also in der P1-Zelle einen Einfluss auf die Verteilung der Proteine MEX-5 und PIE-1, aber CIB-3 hat keine Funktion bei der Polarisierung der Zellen durch die PAR-Proteine. Bisher ist kein anderes Protein bekannt, das nach der Etablierung der corticalen Zellpolarität die Segregation der somatischen und P-Zell-spezifischen Proteine vermittelt. In der Diskussion wird ein Modell vorgestellt, welche Funktion CIB-3 in der Embryonalentwicklung übernimmt.

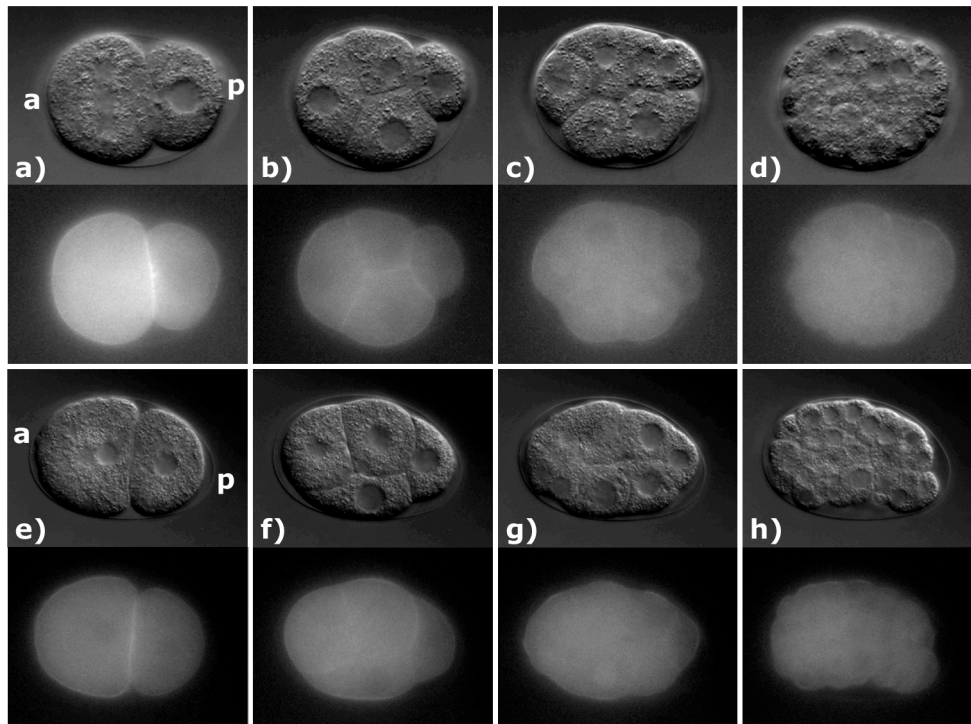


Abbildung 2.34: PAR-6::GFP in WT-Embryonen und in Embryonen mit *cib-3*-RNAi. a) – d) WT-Embryo, in dem das PAR-6::GFP-Fusionsprotein (Cuenca *et al.*, 2003) exprimiert wurde. Oben ist die Nomarski-Ansicht dargestellt, unten die Ansicht im Fluoreszenzkanal. a) PAR-6::GFP war im 2-Zell-Stadium deutlich am Zell-Zell-Kontakt erkennbar und rund um die anteriore AB-Blastomere verteilt. b) Im 4-Zell-Stadium lokalisierte das Protein genauso an den Zell-Zell-Kontakten und um die somatischen Blastomeren ABa, ABp und EMS. c) In diesem Stadium war die Verteilung von PAR-6::GFP nur noch undeutlich zu erkennen. Die Zell-Zell-Kontakte waren schwach gefärbt und in den AB-Tochterzellen lokalisierte das Fusionsprotein im Zellkern. d) Das GFP-Signal wurde immer schwächer und war undeutlich an Zell-Zell-Kontakten und in einigen Zellkernen zu sehen. Die corticale Lokalisation in somatischen Zellen war nicht mehr zu unterscheiden. e) – h) Embryonen mit dem PAR-6::GFP-Fusionsprotein und *cib-3*-RNAi. Es ließ sich kein Unterschied bei der Lokalisierung des Proteins erkennen. e) Im 2-Zell-Stadium band PAR-6::GFP am Zell-Zell-Kontakt und um die anteriore AB-Blastomere. f) Im 4-Zell-Stadium lokalisierte das Fusionsprotein ebenfalls wie im Ausgangsstamm. g) In diesem Stadium war PAR-2::GFP wieder undeutlich an Zell-Zell-Kontakten und in den Zellkernen der AB-Tochterzellen nachweisbar. h) Das Fusionsprotein war so schwach zu sehen, dass die Lokalisierung nicht mehr eindeutig war, es sah aus wie im Ausgangsstamm. Anterior (a) und posterior (p) sind in a) und e) gekennzeichnet.

Die Defekte bei der Zellteilung der P1-Zelle in *cib-3*-Embryonen betrafen vor allem die Segregation von zwei Proteinen, die das Schicksal der Zellen determinieren. In seltenen Fällen wurde ein weiterer Phänotyp beobachtet, bei dem die Position der Spindel in der Zelle verschoben war. Der Verschiebung folgte eine „umgekehrte Zellteilung“ der P1-Zelle.

2.18 Die P1-Zelle teilt sich in seltenen Fällen „umgekehrt“

Der typische *cib-3*-Phänotyp wurde außer in den *cib-3(e2280)*-Embryonen und den *cib-3*-RNAi-Embryonen auch bei RNAi-Embryonen von *rack-1* und dem Cathepsin L (F57F5.1) beobachtet. Die symmetrischen Zellteilungen traten in den Zellen P₁, P₂ und P₃ auf. In seltenen Fällen war die Zellteilung der P₁-Zelle sogar umgekehrt zu den normalen Zellteilungen. Nach der Teilung war die EMS-Zelle kleiner als die P₂-Zelle. Diese ungewöhnliche Teilung trat sowohl nach *rack-1*-RNAi als auch nach *cib-3*-RNAi auf (siehe Abbildung 2.35). Nach der umgekehrt asymmetrischen Zellteilung lokalisierte der größere Teil des PIE-1::GFP in der kleineren EMS-Zelle. Diese umgekehrte Zellteilung der P₁-Zelle trat jeweils zufällig unter den zuletzt befruchteten Embryonen bei RNAi-Experimenten auf. Da der interessante Phänotyp nicht gezielt reproduziert wurde, konnte er in dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden.

Die Größe der Zellen nach der Zellteilung hängt von der Position der Spindel in der Mutterzelle ab. In *C. elegans* sind verschiedene Mutanten bekannt, bei denen die Spindelposition in der Zygote entlang der a-p-Achse verschoben ist (Colombo *et al.*, 2003; Gotta und Ahringer, 2001). Bei diesen Mutanten ist nach der Zellteilung auch die Größe der Tochterzellen verändert. In den hier beschriebenen Embryonen ist nur die Zellteilung der P₁-Zelle betroffen, nicht die der Zygote. Die Spindel dreht sich wie in WT-Embryonen und wird danach auf der a-p-Achse falsch positioniert. Alle drei Proteine beeinflussen die Spindelposition in der P₁-Zelle. Bisher ist in der P₁-Zelle und den anderen P-Zellen außer der Zygote kein Prozess bekannt, der die Spindel entlang der Zellachse positioniert. Ohne einen reproduzierbaren Phänotyp kann die Spindelpositionierung jedoch nicht weiter analysiert werden. Vielleicht kann die umgekehrte Zellteilung mit teilweise komplementierten *knock-out*-Embryonen erzeugt werden, aber bisher existieren keine Deletionsallele von *cib-3* und den Interaktionspartnern.

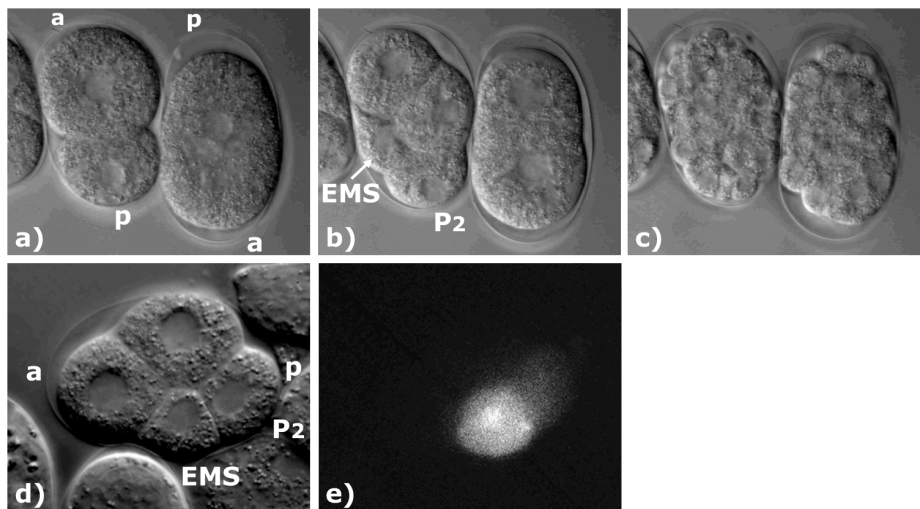


Abbildung 2.35: In manchen Embryonen war die Zellteilung der P1-Zelle „umgekehrt“. a) – c) Zwei WT-Embryonen mit *rack-1*-RNAi. a) Die frühen Stadien wurden normal gebildet. b) Im linken Embryo war die EMS-Zelle kleiner als die P2-Zelle. c) Die Embryonen starben sehr früh mit 80 Zellen. d) – e) WT-Embryonen mit einem PIE-1::GFP-Fusionsprotein und *cib-3*-RNAi. d) In der Nomarski-Ansicht war wieder die EMS-Zelle kleiner als die P2-Zelle. e) Ansicht des gleichen Embryos zum gleichen Zeitpunkt wie in d) im Fluoreszenzkanal. In diesem Embryo war auch die Verteilung von PIE-1::GFP umgekehrt, das Protein wurde fast vollständig in die kleinere EMS-Zelle segregiert. Anterior (a) und posterior (p) sind in a) und d) gekennzeichnet.

cib-2

Das Gen *cib-2* ist das dritte *cib*-Gen aus der Mutantensammlung des Labors, das in dieser Arbeit ansatzweise charakterisiert wird. Das Gen wurde 2006 von Henning Schmidt kloniert.

2.19 Der Phänotyp der Mutanten ist der typische *cib*-Phänotyp

In Cambridge wurden die beiden Mutanten *cib-2(e2293)* und *cib-2(e2294)* von Ralf Schnabel isoliert und in die Gruppe der *cib*-Gene eingeordnet. Die Mutanten wurden von Claudine Eder in ihrer Diplomarbeit kartiert und charakterisiert (Eder, 1990). Der beschriebene Phänotyp wird hier kurz vorgestellt und dann überprüft.

Erste Charakterisierung von *cib-2(e2293)* und *cib-2(e2294)* durch Claudine Eder

Nach der Einordnung der beiden maternal letalen ts-Allele *cib-2(e2293)* und *cib-2(e2294)* als *cib*-Mutanten wurde der Phänotyp genauer untersucht (Eder, 1990). Je nach Allel teilen sich P2 oder P3 symmetrisch statt asymmetrisch. In heterozygoten Embryonen über einer Defizienz (*cib-2(e2293)/nDf3*) wurden auch symmetrische

Zellteilungen der P1-Zelle beobachtet. Die Teilungen der Zygote waren unverändert, aber sämtliche Teilungen in der P-Zelllinie waren verzögert. Nach einer symmetrischen Zellteilung wurden die P-Granulae in beide Tochterzellen segregiert. Alle weiteren Zellteilungen danach waren in der P-Zelllinie auch symmetrisch. Das Teilungsmuster der EMS-Zelllinie war verzögert und verändert. Die Teilungen der MS- und E-Zelllinie waren wie bei der Mutante *cib-3(e2280)* gleichzeitig oder vertauscht.

In der Mutante *cib-2(e2294)* wurden zwei spezifische ts-Phasen beobachtet. In der ersten Phase war das maternale Protein essentiell für die frühe Embryogenese von der Befruchtung bis zum 100-Zell-Stadium. Wenn die Embryonen einmal bei der restriktiven Temperatur inkubiert wurden, war der Effekt der Mutation wie bei *cib-1(e2300)* auch bei der permissiven Temperatur nicht reversibel. Die zweite ts-Phase der Mutanten in *cib-2* zeigte eine zygotische Funktion des Gens in der Larvalentwicklung. In dieser Phase entwickelten sich sterile Hermaphroditen, in denen während der zweiten mitotischen Phase in der Gonade weniger Keimzellen gebildet wurden. Sekundär wurden auch Fehlentwicklungen in den Spermatheka und in der Vulva beobachtet. Zu Beginn dieser Arbeit wurden die verschiedenen Stämme aufgetaut und der Phänotyp überprüft.

Überprüfung des Phänotyps von *cib-2(e2293)* und *cib-2(e2294)* in dieser Arbeit

Die Stämme mit den beiden Allelen *cib-2(e2293)* und *cib-2(e2294)* waren in der Stammsammlung des Schnabel-Labors in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach 15 Jahren Kryokonservierung wurde der Phänotyp der Stämme überprüft. Alle beschriebenen Defekte (Eder, 1990) wurden wieder beobachtet (siehe Abbildung 2.36). In den Embryonen kam es zu symmetrischen Zellteilungen der Zellen P2 und P3. Zusätzlich war das Zellteilungsmuster der EMS-Zelllinie verändert, die Zellen MS und E teilten sich oft gleichzeitig. Nach dem Auskreuzen der beiden Stämme durch Jasmin Fetisch war der Effekt der Mutation *cib-2(e2293)* verstärkt, die Hermaphroditen waren bei der restriktiven Temperatur steril. Das Gen *cib-2* wurde von Henning Schmidt kloniert.

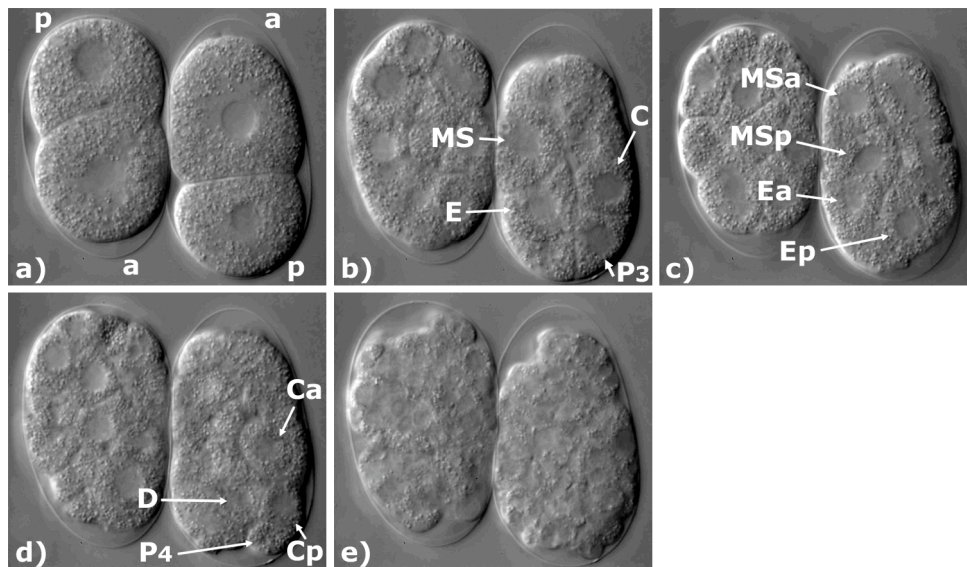
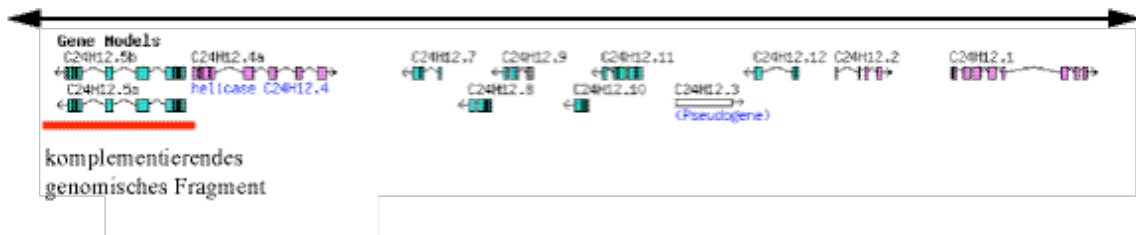


Abbildung 2.36: Zwei *cib-2(e2293)*-Embryonen. a) Die frühe Embryonalentwicklung war normal. Anterior (a) und posterior (p) sind gekennzeichnet. b) Im rechten Embryo teilte sich die P2-Zelle symmetrisch, die Zellen C und P3 waren gleich groß in einer Ebene zu sehen. c) Die Zellen MS und E teilten sich im rechten Embryo genau gleichzeitig statt mit 2 min. Abstand wie in WT--Embryonen. d) Die Zellen C und P3 teilten sich gleichzeitig weiter. Im linken Embryo teilten sich auch MS und E gleichzeitig und die P2-Zelle symmetrisch (hier nicht dargestellt). e) Die Embryonen starben mit 150 Zellen, die durch die veränderten Zellteilungen unterschiedlich groß waren.

2.20 Klonierung des Gens *cib-2* durch Henning Schmidt

Nach Kartierungen durch Ralf Schnabel und Claudine Eder liegt das Gen *cib-2* auf Chromosom II zwischen *unc-85* und *dpy-2* unter der Defizienz *nDf3*. Henning Schmidt und Jasmin Fetisch haben den Bereich, in dem das Gen liegt, mit einer SNP-Kartierung weiter eingegrenzt und danach die Mutante *cib-2(e2294)* mit dem YAC Y44G6 komplementiert. Die postulierten ORFs in diesem Bereich wurden sequenziert. Sequenzierungsanalysen ergaben insgesamt vier verschiedene Mutationen in dem ORF C24H12.5 (siehe Abbildung 2.37) in den verschiedenen Allelen. Die Klonierung des Gens wurde durch die Komplementation der Mutante *cib-2(e2294)* mit einem genomischen Fragment, auf dem der ORF mit Promotor und 3'UTR lag, bestätigt (siehe auch Kapitel 2.2, S. 17 und 2.9, S. 51). Nach der Injektion von *cib-2*-dsRNA in WT-Hermaphroditen wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls der gleiche Phänotyp wie in den Mutanten beobachtet.

Gene auf C24H12

Abbildung 2.37: Die Position des Gens *cib-2* auf C24H12.

Ein Vergleich der codierenden Sequenz von *cib-2* mit Datenbanken ergab (<http://www.wormbase.org>), dass das Protein von der Hefe bis zum Menschen konserviert ist. Es besitzt aber keine bekannten Proteindomänen. Die codierende Sequenz ist 1.833 bp lang und codiert für ein Protein von 610 AS. Bisher ist keine Funktion für das Protein bekannt. Um die Funktion des Gens in dieser Arbeit zu identifizieren, wurde die Ähnlichkeit des Phänotyps der Mutanten *cib-2(e2293)* und *cib-2(e2294)* zu den anderen beiden *cib*-Mutanten getestet.

2.21 *cib-2* hat eine andere Funktion als *cib-1* und *cib-3*

Der Phänotyp von *cib-2(e2293)* und *cib-2(e2294)* sieht den Phänotypen der Mutanten von *cib-1* und *cib-3* sehr ähnlich. Die beiden Gene *cib-1* und *cib-3* haben aber sehr unterschiedliche Funktionen in der embryonalen Keimbahnentwicklung. CIB-1 ist an der Thymidylat-Synthese beteiligt und verzögert die Zellteilungen durch die Aktivierung der G2-Zellzyklus-Kontrolle. Dagegen steuert CIB-3 die Segregation von keimbahnspezifischen Proteinen wie PIE-1 und somatischen Proteinen wie MEX-5. Die Mutanten *cib-2(e2293)* und *cib-2(e2294)* wurden mit den beiden anderen Mutanten verglichen.

Die Zellzyklus-Kontrolle wird in *cib-2(e2294)* in der adulten Keimbahn aktiviert

Das Zellteilungsmuster der P-Zelllinie in *cib-2(e2294)* ist wie in den anderen Mutanten verzögert. Bei der Inhibition an dem G2-Zellzyklus-Kontrollpunkt durch *atl-1 chk-1*-RNAi teilten sich die Zellen in *cib-1(e2300)*-Embryonen wieder wie in WT-Embryonen (siehe Kapitel 2.5, S. 35). Diese Wirkung muss der RNAi auch in *cib-2(e2294)*-Embryonen haben, wenn in *cib-2(e2294)* die G2-Zellzyklus-Kontrolle aktiviert wird.

Der *atl-1 chk-1*-RNAi wurde wie in *cib-1(e2300)* auch in *cib-2(e2294)* durchgeführt. Die L4-Larven, die mit den dsRNA-Bakterien gefüttert wurden, entwickelten sich zu sterilen Hermaphroditen. Daher konnten die Zellteilungsmuster der Embryonen nicht mit anderen verglichen werden. Das Experiment mit *atl-1 chk-1*-RNAi in *cib-2(e2294)* kann die Fragestellung nicht beantworten, da ein neuer, unerwarteter Phänotyp beobachtet wurde. Es ist möglich, dass die zygotische Funktion von *cib-2* die G2-Zellzyklus-Kontrolle aktiviert. Um dieser neuen Frage nachzugehen, sollten in weiterführenden Arbeiten die Gonaden und Keimbahnzellen der Hermaphroditen untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Funktionen von CIB-2 und CIB-3 verglichen.

Die Segregation spezifischer Proteine in Mutanten von *cib-2* ist normal

In *cib-3*-Embryonen war der erste sichtbare Defekt die Fehlverteilung des somatischen Proteins MEX-5 und des P-Zell-spezifischen PIE-1 während der Zellteilung der P1-Zelle. Wenn *cib-2* eine Funktion in dem gleichen Prozess wie *cib-3* übernimmt, müssten auch in *cib-2*-Embryonen die beiden Proteine falsch segregiert werden. Diese Hypothese wurde durch eine Kreuzung von *cib-2(e2294)* mit dem Stamm JH1327, in dem das PIE-1::GFP-Fusionsprotein exprimiert wurde, getestet. Von den Kreuzungsnachkommen mit GFP-Fusionskonstrukt und *cib-2(e2294)* wurden mehrere unabhängige Linien etabliert und am 2-Kanal-4D-Mikroskop ausgewertet. Die Lokalisierung des PIE-1::GFP-Fusionsproteins war in den *cib-2(e2294)*-Embryonen nicht verändert, das Protein wurde während der Zellteilungen in den P-Zellen nicht symmetrisch verteilt. CIB-2 hat keine Funktion bei der Segregation der Proteine PIE-1 und MEX-5.

Nach diesen Ergebnissen ist die Funktion von CIB-2 weder mit der Funktion von CIB-3 noch mit der von CIB-1 zu vergleichen.

3 Diskussion

Bisher ist weitgehend unbekannt, wie Stammzellen ihre besonderen Differenzierungsmöglichkeiten erhalten und wie die Entwicklung dieser Zellen reguliert wird. Die Keimbahnzellen sind als Untergruppe der Stammzellen von allen anderen Zellen deutlich zu unterscheiden, da sie nicht nur zu der Entstehung von pluripotenten somatischen Zellen beitragen, sondern auch zu den totipotenten Gameten. Aus Sicht der Genetik gehören Gameten und Keimbahnzellen zu den interessantesten Zellen überhaupt, da die Vererbung hauptsächlich von der Funktionalität dieser Zellen abhängt. Im Vergleich dazu erscheint die Entwicklung anderer Zellen, wie z.B. der Geruchsrezeptoren, für die Vermehrung der Art nebensächlich.

Das Entwicklungspotenzial von Keimbahnzellen wird in vielen mehrzelligen Organismen während der ersten Zellteilungen festgelegt und von Zelle zu Zelle weitergegeben. Diese frühen Zellen besitzen bereits alle Eigenschaften, die für Keimbahnzellen charakteristisch sind. Die einzigen Zellen, die während der Embryogenese von *C. elegans* das Keimbahnpotenzial besitzen, sind die stammzellartigen Zellen P1 bis P4 und Z2 bzw. Z3. In den Teilungen dieser Zellen werden keimbahnspezifische Faktoren wie die P-Granulae asymmetrisch segregiert, so dass die Tochterzellen neben der unterschiedlichen Zellgröße auch ein unterschiedliches Entwicklungspotenzial bekommen. Das Zellteilungsmuster ist spezifisch für die P-Zelllinie und läuft nach einer genau definierten Zellzyklus-Uhr (*developmental clock*) ab. Die ersten Hinweise auf Signalwege, die bei Entwicklung der P-Zellen eine Rolle spielen, lieferte die Analyse von Mutanten in den drei *cib*-Genen (Schnabel und Schnabel, 1990; Eder, 1990 und Feichtinger, 1990). *cib* bedeutet *changed identity of blastomeres*, die Mutanten in den drei Genen haben Defekte bei der Entwicklung der embryonalen Keimbahn. Mit der Charakterisierung der drei *cib*-Mutanten wurde im Rahmen dieser Arbeit die Suche nach molekularen Regulationsprozessen für die Entwicklung der Keimbahn weitergeführt.

Mit der Mutante *cib-1(e2300)* wird erstmals ein Zusammenhang zwischen der Nukleotidsynthese und der Zellzyklus-Kontrolle für die Keimbahnentwicklung gezeigt. *cib-3* reguliert in einem hier neu beschriebenen Prozess die Segregation von

keimbahnspezifischen Faktoren sowie die Asymmetrie der Zellteilungen. *cib-2* vermittelt zusätzlich zu einer Funktion in der embryonalen Keimbahn einen Prozess bei der Entwicklung der Gonaden.

Die drei Gene werden im Folgenden einzeln diskutiert. Danach wird die Bedeutung der verschiedenen Funktionen aller drei Gene bei der Keimbahnentwicklung betrachtet.

3.1 *cib-1*

Die Mutanten *cib-1(e2300)* und *cib-1(e2303)* haben Defekte in der P-Zellinie, die alle keimbahnspezifischen Eigenschaften der Zellen betreffen (Schnabel und Schnabel, 1990). Eine spezifische Funktion in der Keimbahn wird auch von der ts-Phase der Mutante *cib-1(e2300)* angedeutet. Das Zellteilungsmuster der P-Zellen ist verzögert und keimbahnspezifische Faktoren wie die P-Granulae werden abgebaut. Je nach der Länge der Verzögerung teilt sich eine der Zellen symmetrisch und das P-Schicksal geht verloren. Die Zellen nehmen das Schicksal der somatischen Tochterzelle an und die Zellinie ist dementsprechend verändert. *cib-1* codiert überraschend für ein Gen, das an der Nukleotidsynthese beteiligt ist.

Das Gen *cib-1* codiert für die einzige Thymidylat-Synthase in *C. elegans*

Die Klonierung des Gens *cib-1* zeigte, dass es für die einzige Thymidylat-Synthase in *C. elegans* codiert. Die Beteiligung des essentiellen Enzyms an einem so spezifischen Prozess wie der embryonalen Keimbahnentwicklung erschien zunächst extrem unwahrscheinlich, da bisher kein Zusammenhang zwischen der Nukleotidsynthese und der Keimbahnentwicklung vermutet wurde. Der RNAi von *cib-1* erzeugt dieselben Phänotypen wie die der Mutanten *cib-1(e2300)* und *cib-1(e2303)*. Die konservierte Thymidylat-Synthase-Domäne erstreckt sich außer über 26 Aminosäuren (AS) am N-Terminus über das gesamte Protein, dessen Funktion als Thymidylat-Synthase bereits *in vitro* bestätigt wurde (Winska *et al.*, 2005). Es gibt keinen Hinweis auf andere Funktionen, und Spleißvarianten des Proteins sind nicht bekannt. Die beiden Mutationen in *cib-1* liegen in der Region, in der der Cofaktor bindet (Finer-Moore *et al.*, 2003). In mutierter Form kann die Thymidylat-Synthase wahrscheinlich weniger effizient den Cofaktor CH₂H₄-Folat binden. Eine Messung der Proteinaktivität könnte,

ähnlich den Untersuchungen am endogenen Enzym in Zelllysaten (Winska *et al.*, 2005), die herabgesetzte Aktivität des mutierten Enzyms zeigen.

Für die Charakterisierung der Mutanten in dem Gen *cib-1* (Schnabel und Schnabel, 1990) standen sechs verschiedene Stämme zur Verfügung, die bis zur Klonierung des Gens für verschiedene Allele mit unterschiedlichen Phänotypen gehalten wurden. Die Sequenzierung der sechs Allele ergab nur zwei Allele, *cib-1(e2300)* und *cib-1(e2303)*. Die unterschiedlichen Phänotypen erklären sich durch die erstaunlich große Variabilität der Embryonen. Nach der aufwendigen Analyse von mehr als 300 Embryonen haben fünf Allele den gleichen variablen Phänotyp. Nur das nicht temperatursensitive Allel *cib-1(e2303)* zeigt einen früheren Phänotyp (siehe Kapitel 2.1, S. 15). Vor fast 20 Jahren war die Auswertung von mehr als zehn Embryonen pro Stamm schon die oberste Grenze der technischen Möglichkeiten. Erst durch die Weiterentwicklung der 4D-Mikroskopie durch Ralf Schnabel (Schnabel *et al.*, 1997) konnte das Phänomen der phänotypischen Varianz in *cib-1(e2300)* aufgeklärt werden.

cib-1 ist als Y110A7A.4 annotiert und codiert für die einzige Thymidylat-Synthase in *C. elegans*.

Der RNAi von Genen der Thymidylat-Synthase führt zum gleichen Phänotyp

Winska *et al.* (2005) haben außer der Aktivität der Thymidylat-Synthase auch die spezifischen Enzymaktivitäten von anderen konservierten Enzymen gemessen, die in *C. elegans* an der dTTP-Synthese beteiligt sind. Zu diesen Enzymen gehören die dUTP-Pyrophosphatase und die Thymidylat-Kinase, die die beiden Reaktionen unmittelbar vor und nach CIB-1 vermitteln. Die Gene für die beiden Enzyme sind sehr konserviert und kommen nur einmal im *C. elegans* Genom vor. In RNAi-Experimenten von beiden Genen (siehe Kapitel 2.4, S. 25) wurden in dieser Arbeit die gleichen Phänotypen beobachtet wie in den beiden Mutanten *cib-1(e2300)* und *cib-1(e2303)*. Alle drei Genprodukte sind an der dTTP-Synthese beteiligt.

Die Untersuchung des Gens *cib-1* zeigt, welche interessanten Folgen die Defekte in der Synthese des Nukleotids dTTP haben. Alle anderen Nukleotide werden hergestellt, indem verschiedene Enzyme bei mindestens jeweils zwei Nukleotiden die gleiche Reaktion katalysieren. Mutationen in den betreffenden Genen oder RNAi-Experimente

haben gravierende Auswirkungen und zeigen dementsprechend sehr frühe und starke Defekte. Nur die Synthese von dTTP kann gezielt reduziert werden. Nach der verringerten Synthese von dTTP können die Auswirkungen auf die Entwicklung eines Embryos beobachtet werden.

Der Phänotyp von *cib-1(e2300)*-Embryonen führt in der frühen Embryonalentwicklung zu der Entdeckung eines neuen Zusammenhangs zwischen der Nukleotidsynthese, der Zellzyklus-Kontrolle, und der Keimbahnentwicklung. Dieser Zusammenhang wurde bisher nicht vermutet. Bevor die Funktion von *cib-1* in der embryonalen Keimbahnentwicklung betrachtet wird, wird ein weiterer Effekt der RNAi-Experimente diskutiert.

***cib-1* hat eine Funktion bei der Gametenentwicklung**

In allen drei RNAi-Experimenten von den singulären Genen bei der dTTP-Synthese nahm der RNAi-Effekt über die Zeit zu. Die injizierten Hermaphroditen legten insgesamt weniger Eier ab als Hermaphroditen, die mit Kontroll-dsRNA injiziert wurden. Die geringe Menge an befruchteten Eiern wurde in der gleichen Zeit gelegt wie eine vergleichbare Anzahl an Eiern in der Kontrollgruppe, d.h. die Rate an gelegten Eiern pro Stunde war unverändert. Die Hermaphroditen wurden aber durch den *cib-1*-RNAi vorzeitig steril und produzierten keine Oozyten mehr (siehe z.B. Kapitel 2.3, S. 22). Dieser Phänotyp entsteht offensichtlich durch die stark reduzierte Menge an Thymidylat und entspricht dem erwarteten Null-Phänotyp des Gens. Ohne Thymidylat-Synthase können die Hermaphroditen kein dTTP mehr bilden und damit auch die DNA nicht replizieren. Danach werden keine weiteren Oozyten mehr gebildet. An welcher Stelle der Entwicklung die DNA-Synthese in der adulten Gonade kontrolliert wird, ist nicht bekannt. Wahrscheinlich wirken in der adulten Gonade ähnliche Kontrollmechanismen wie während der Entwicklung der embryonalen Keimbahn.

Der Nukleotidmangel führt zu einer verlängerten Interphase

Die Mutanten *cib-1(e2300)* und *cib-1(e2303)* und die RNAi-Embryonen haben auch Probleme beim Ablauf des Zellzyklus. Die P-Zellen haben eine verlängerte Interphase und teilen sich stark verzögert. Beide Defekte treten auch in Mutanten von *div-1* auf (Encalada *et al.*, 2000), das für eine B-Untereinheit des DNA-Polymerase- α -Primase-Komplexes codiert und an der Replikation beteiligt ist. Als Folge der verschiedenen

Defekte in den Mutanten der Gene *cib-1* und *div-1* differenzieren in der EMS-Zelllinie die Zellen nicht zu Darm und Pharynxmuskel. Encalada *et al.* (2000) vergleichen den Phänotyp der Mutanten von *div-1* in diesem Punkt mit dem Phänotyp der Mutante von *skn-1* (Bowerman *et al.*, 1992). Die Funktionen der beiden Gene *cib-1* und *div-1* werden jedoch für die Embryonalentwicklung früher als die von *skn-1* benötigt (siehe Kapitel 2.5, S. 32). Die primären Defekte in den Mutanten betreffen im Gegensatz zu denen in *skn-1* die P-Zelllinie und die Dauer des Zellzyklus in der P-Zelllinie. Die Dauer eines Zellzyklus ist von verschiedenen Faktoren der Zellzyklus-Kontrolle wie den beiden Kinasen *atl-1* und *chk-1* abhängig. In *cib-1(e2300)*-Embryonen wie in *div-1(or148)* teilen sich die Zellen nach dem Ausschalten der Zellzyklus-Kontrollpunktes durch *atl-1 chk-1*-RNAi (Brauchle *et al.*, 2003) nicht mehr verzögert (siehe Kapitel 2.5, S. 32). Die G2-Zellzyklus-Kontrolle wird in *cib-1(e2300)*-Embryonen aktiviert.





Die Defekte lassen sich in *cib-1*-Embryonen genau wie bei *div-1*-Embryonen erst nach dem RNAi mit *atl-1 chk-1* zeigen. Nach Inaktivierung des Zellzyklus-Kontrollkinasen wird der Zellzyklus nicht mehr verzögert. Die DNA-Fragmente werden bei der nächsten Zellteilung chaotisch zwischen den Zellen verteilt (siehe Kapitel 2.5, S. 32). In *cib-1*-Embryonen werden Zellzyklus-Kontrollpunkte aktiviert. Dadurch wird der Zellzyklus transient angehalten und die Herstellung einer ausreichenden Menge dTTP für die Replikation ermöglicht.

Welcher Zellzyklus-Kontrollpunkt wird in *cib-1(e2300)*-Embryonen aktiviert?

Nach Messungen der DNA-Menge in *cib-1*-Embryonen gibt es Beobachtungen, nach denen die P-Zellen vor der Replikation pausierten (Schnabel und Schnabel, 1990). Die RNAi-Experimente mit *atl-1* und *chk-1* zeigen, dass die Zellen in *cib-1(e2300)*-Embryonen in der G2-Phase anhalten. Beide Beobachtungen führen zu der Frage, welche Zellzyklus-Kontrollpunkte während der Embryogenese bestehen und welche in *cib-1(e2300)* aktiviert werden.

Um zu überlegen, welche Zellzyklus-Kontrollpunkte während der frühen Embryogenese von *C. elegans* bestehen, wird zunächst ein Überblick über den Zellzyklus und über die Zellzyklus-Kontrolle mit den verschiedenen Kontrollpunkten gegeben. Der Zellzyklus einer Zelle wird in vier Phasen gegliedert. In der ersten Phase G1 (G steht für *gap*) wächst die Zelle und ergänzt fehlende Bestandteile des Cytoplasmas sowie Zellorganel-

len. Neben der Transkription von mRNAs, deren Produkte in der S-Phase (DNA-Synthese-Phase) benötigt werden, steigt der Vorrat an Nukleotiden. In der S-Phase wird

| Zellzyklus | Phase | Menge an Cyclin | CdK | Homolog in <i>C. elegans</i> | Phänotyp von Mutanten | Phänotyp nach RNAi |
|-------------|-------|---|-----------|--|--------------------------------|--|
| Inter-phase | G1 |  D | CDK4/CDK6 | <i>cyd-1</i> <i>cdk-4</i> | G1-Stop, ab späte Embryogenese | |
| | S |  E | CDK2 | <i>cye-1</i> (<i>cdk-2</i>) | späte larvale Defekte | 100-Zell-Stop, keine Zellzyklusverzögerung (nur 43% homolog), variabel |
| | G2 |  A | CDK2 | <i>cya-1</i> (<i>cdk-2</i>) | | (nur 43% homolog), variabel |
| Mitose | M |  B | CDK1 | <i>cyb-1</i> <i>cyb-3</i> <i>cdk-1</i> | G2-Stop ab L1 | 1-Zell-Stop |

die DNA repliziert und die notwendigen Histone werden produziert. Die dritte Phase ist die G2-Phase, in der die Mitose vorbereitet wird (siehe Abbildung 3.1). Danach teilt sich die Zelle und in jeder Tochterzelle beginnt der Zellzyklus von vorn.

Abbildung 3.1: Die Phasen des Zellzyklus und die an der Zellzyklus-Kontrolle beteiligten Proteine. Zusätzlich sind die homologen Proteine in *C. elegans* dargestellt und die bekannten Phänotypen sowohl von Mutanten als auch nach RNAi. Die Tabelle wurde zusammengefasst dargestellt nach van den Heuvel (2005).

Der korrekte Ablauf des Zellzyklus wird von der Aktivität der Cycline und CdKs (*cyclin dependent kinase*) gesteuert. Diese Proteine sind in Organismen wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Schizosaccharomyces pombe* intensiv beschrieben worden (Alberts, 1995). In der Hefe binden in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus verschiedene Cycline an eine CdK. In dem entstehenden Proteinkomplex bilden die Cycline die regulatorische Untereinheit und die CdK die katalytische Untereinheit. Gemeinsam steuern diese Proteine den Zellzyklus. In anderen Organismen gibt es außer den verschiedenen Cyclinen auch mehrere konservierte CdKs (siehe Abbildung 3.1 oben). Der Zellzyklus wird in den verschiedenen Phasen an den Zellzyklus-Kontrollpunkten kontrolliert. Ein Zellzyklus-Kontrollpunkt wird z.B. in der G2-Phase aktiviert, wenn die DNA-Replikation unvollständig oder fehlerhaft ist. Nach der Aktivierung wird der Zellzyklus in der G2-Phase vor dem Beginn der Zellteilung inhibiert. Zum G2-Zellzyklus-Kontrollpunkt gehören die beiden Kinasen *atl-1* und *chk-1*. ATL1 aktiviert durch Phosphorylierung Chk1, das dann eine Phosphatase (Cdc25) phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung wird Cdc25 deaktiviert und damit

die Aktivität der Zellzyklus-Kinase Cdc2 abgesenkt (Abraham, 2001; Rhind und Russell, 2000). Neben diesem Zellzyklus-Kontrollpunkt in der G2-Phase gibt es normalerweise noch weitere Kontrollpunkte, z.B. in der Mitose oder in der G1-Phase.

In Embryonen läuft der Zellzyklus prinzipiell genauso ab, aber es ergeben sich je nach Organismus verschiedene Besonderheiten. So entwickeln sich die Zellen in *Drosophila* und *Xenopus* am Anfang sehr schnell und scheinbar ohne die beiden *gap*-Phasen (Dasso und Newport, 1990; Edgar und McGhee, 1988; Kimelman *et al.*, 1987; Raff und Glover, 1989). Die Replikation wird während dieser schnellen embryonalen Teilungen nicht kontrolliert. In *C. elegans* teilen sich die Zellen in der frühen Embryogenese ohne Zellwachstum und die Zellen werden mit jeder Generation kleiner. Es ist bisher weitgehend unbekannt, wie die Zellzyklus-Kontrolle während dieser frühen Teilungen funktioniert. Konservierte Cycline und CdKs gibt es auch in *C. elegans*. Mutanten und Phänotypen nach RNAi sind aber nur für einige dieser konservierten Proteine bekannt (Abbildung 3.1). Die meisten Phänotypen zeigen eine Funktion der Proteine während der Larvalentwicklung und teilweise schon in der späten Embryonalentwicklung (Boxem *et al.*, 1999; Boxem und van den Heuvel, 2001; Yanowitz und Fire, 2005). In der frühen Embryonalentwicklung zeigt nur der RNAi von *cye-1* einen Phänotyp (Brodigan *et al.*, 2003; Fay und Han, 2000). Bisher wurde nur für die beiden Zellzyklus-Kontrollkinasen *atl-1* und *chk-1* eine Funktion bei der Zellzyklus-Kontrolle im frühen *C. elegans*-Embryo beschrieben (siehe Kapitel 2.5, S. 34 und Brauchle *et al.*, 2003).

In welcher Phase wird die Zellzyklus-Kontrolle in den Zellen von *cib-1(e2300)*-Embryonen aktiviert? Nach dem *atl-1 chk-1*-RNAi in *cib-1(e2300)* wurden in dieser Arbeit mit einem Histon::GFP-Konstrukt Lücken in der DNA nachgewiesen (siehe Kapitel 39, S. 37). Der G2-Zellzyklus-Kontrollpunkt wird in *cib-1(e2300)*-Embryonen aktiviert. Dieser Zellzyklus-Kontrollpunkt besteht also schon während der frühen Embryogenese von *C. elegans*. Die Messungen der DNA-Menge von Schnabel und Schnabel (1990) ergeben, dass die P-Zellen vor der S-Phase pausieren. Neben dem G2-Zellzyklus-Kontrollpunkt gibt es daher auch Hinweise auf eine Aktivierung des Kontrollpunktes in der G1-Phase. Für den Nachweis dieses Kontrollpunktes sind weitere Experimente notwendig. In RNAi-Embryonen von *cye-1* könnte dieser Zellzyklus-Kontrollpunkt in der frühen Embryogenese aktiviert werden.

In die Zellzyklus-Kontrolle der weiteren Embryonalentwicklung wurden in dieser Arbeit mit Hilfe der spezifischen ts-Phase der Mutante *cib-1(e2300)* neue Einblicke gewonnen.

Die Aktivierung der Zellzyklus-Kontrolle und die ts-Phase von *cib-1(e2300)*

Die Zelllinie der *C. elegans*-Embryonen ist genau festgelegt und zeitlich abgestimmt. Die „Entwicklungsuhr“ (*developmental clock*, Dan und Ikeda, 1971) koordiniert die Zellteilungen einer Zelle in Bezug zu ihren Nachbar- und Schwesterzellen. Die Reihenfolge der Zellteilungen während der Embryogenese ist für die Entwicklung der Zelllinie essentiell, doch bisher sind die molekularen Grundlagen für diese Uhr nicht genau geklärt. Es ist möglich, dass die komplexe Maschinerie der Zellzyklus-Kontrolle auch für die zeitliche Koordination der Zelllinie genutzt wird. Außer *cye-1* und *atl-1* bzw. *chk-1* als konservierte Zellzyklus-Kontrollproteine wird während der Embryogenese erst in den letzten Zellteilungen nach der Morphogenese die Kontrolle der G1-Phase mit *cdk-4* und *cyd-1* aktiv. Der Vergleich von WT-Embryonen und *cib-1*-Embryonen deckt eine weitere Voraussetzung für die zeitliche Koordination der Zellteilungen auf (siehe Kapitel 2.7, S. 41). Die mutanten Embryonen entwickeln sich bei restriktiver Temperatur ab dem 200-Zell-Stadium deutlich langsamer, aber normal und schlüpfen. Der pünktliche Ablauf der Zellteilungen ist also in der späten Embryogenese für die Differenzierung der Zellen nicht wichtig. Die Zellzyklus-Uhr ist nur zu Beginn der Embryogenese für die Zelllinie von *C. elegans* essentiell. Während dieser Zeit erfolgen die Entwicklung der Keimbahn und die Induktionen zur Determination der Zellschicksale.

Diese Ergebnisse zeigen eine komplexe Interaktion zwischen der Zellzyklus-Kontrolle bzw. der Zellzyklus-Uhr und der Keimbahnentwicklung.

Eine Qualitätskontrolle der DNA-Synthese in der Keimbahnentwicklung

In *cib-1(e2300)*-Embryonen kommt es in der P-Zelllinie neben den Verzögerungen in der Interphase auch zu symmetrischen Zellteilungen. Beide Tochterzellen bekommen danach das somatische Zellschicksal und die Keimbahn geht verloren. Nach der Klonierung wurde der Zusammenhang zwischen *cib-1* und der Keimbahnentwicklung in der P-Zelllinie gesucht. Die Mutationen in der Thymidylat-Synthase verhindern die

Herstellung von dTTP, der Zellzyklus wird verzögert. Die verzögerten Zellteilungen werden nach dem Ausschalten der Zellzyklus-Kontrolle mit dem *atl-1 chk-1*-RNAi wieder beschleunigt. Kann dies als Hinweis auf eine direkte Verbindung von der Zellzyklus-Kontrolle zur Keimbahnentwicklung gesehen werden? Interessanterweise teilen sich die P-Zellen in *cib-1(e2300)*-Embryonen nach *atl-1 chk-1*-RNAi in dieser Arbeit zwar schneller, aber immer noch symmetrisch, wie in Lineageanalysen gezeigt wurde. Der RNAi von *atl-1 chk-1* in *cib-1(e2300)* hat also keinen Einfluss auf die Symmetrie der Teilungen und auf das Keimbahnschicksal. Die Asymmetrie der Zellteilungen wird abhängig von der DNA-Integrität festgelegt. Es ist ein interessantes Problem, wie dieser Prozess z.B. genetisch definiert werden könnte.

Die Mutationen in einem Gen, das für ein an der Nukleotid-Synthese beteiligtes Enzym codiert, führen zu Defekten bei der DNA-Integrität. Der Prozess der Zellzyklus-Kontrolle bewahrt den Organismus davor, bei mangelnder DNA-Integrität eine Keimbahn anzulegen. In *C. elegans* führt dieser Prozess zum Tod des Embryos, da außer den Keimbahnzellen auch andere essentielle Zellen durch die Zelllinie nicht ersetzt werden können. In anderen Organismen stellt der Prozess eine gesunde Keimbahn sicher.

3.2 *cib-3*

Die Mutante *cib-3(e2280)* wurde in die Gruppe der *cib*-Mutanten eingeordnet, da der Phänotyp in einigen Aspekten den Mutanten *cib-1(e2300)* und *cib-1(e2303)* ähnlich ist. So ist die ts-Phase von *cib-3(e2280)* wie bei *cib-1(e2300)* identisch. Die P-Zellen teilen sich verzögert und nach einer symmetrischen Teilung werden die P-Granulae abgebaut. Im Gegensatz zu der Schicksalstransformation in *cib-1*-Embryonen teilen sich in *cib-3(e2280)* die Zellen nach einer symmetrischen Teilung meist aber nicht weiter. Stattdessen ist das Teilungsmuster der EMS-Zelllinie verändert. Die E-Zelllinie kann an jeder Position der EMS-Zelllinie vorkommen oder beide Tochterzellen können das gleiche Teilungsmuster haben. Ob die beiden Gene eine Funktion im gleichen Prozess übernehmen, wurde mit einem RNAi-Experiment von *atl-1 chk-1* in *cib-3(e2280)* überprüft.

In *cib-3(e2280)* wird die Zellzyklus-Kontrolle nicht aktiviert wie in *cib-1(e2300)*

Wie in *cib-1(e2300)* wurde der RNAi mit *atl-1* und *chk-1* auch in *cib-3(e2280)* durchgeführt, um die Beziehung zwischen den verzögerten Zellteilungen und der Zellzyklus-Kontrolle aufzudecken (siehe Kapitel 2.11, S. 57). Der RNAi hatte in *cib-3*-Embryonen keinen Einfluss auf das Zellteilungsmuster. In *cib-3(e2280)* wird daher die G2-Zellzyklus-Kontrolle nicht wie in *cib-1(e2300)* aktiviert und das Genprodukt von *cib-3* ist nicht unmittelbar am gleichen Prozess beteiligt. Um die Funktion des Gens in der Keimbahnentwicklung zu untersuchen, wurde das Gen *cib-3* im Rahmen dieser Arbeit kloniert.

***cib-3* codiert für ein nematodenspezifisches Protein ohne bekannte Funktion**

Die Klonierung von *cib-3* in dieser Arbeit wurde durch die Sequenzierung der Mutation und durch die Komplementation der Mutante mit einem genomischen Fragment bestätigt (siehe Kapitel 2.9, S. 48). Das Gen ist nematodenspezifisch und ohne bekannte Funktion. Nach RNAi wurde in den Embryonen der gleiche Phänotyp wie in der Mutante beobachtet. In weiteren Allelen wurde keine andere Mutation gefunden, obwohl Allele wie *cib-3(t1033)* aus unabhängigen Mutagenese-Experimenten stammten und erst Jahre später an einem anderen Ort isoliert wurden. Mittlerweile ist diese Häufung bestimmter Mutationen in *C. elegans* auch aus anderen Laboren bekannt, manchmal wurde sogar dieselbe Mutation in zwei unabhängigen Laboren auf verschiedenen Kontinenten identifiziert (Delattre *et al.*, 2004; Hansen und Schedl, 2006). In anderen Organismen wie *Arabidopsis thaliana* ist dieses Phänomen bereits ausführlich untersucht worden (Greene *et al.*, 2003). Das Mutagen Ethylmethansulfonat (EMS), das auch in diesem Labor für die Mutagenese eingesetzt wird, mutiert bevorzugt in Sequenzen wie AGA, GGA oder AGG das mittlere Guanin zu Adenin. In *cib-3(e2280)* ist die gleiche Sequenz GGA zu GAA mutiert. Aus diesem Grund steht für diese Arbeit nur ein temperatursensitives Allel für die Analyse der Genfunktion von *cib-3* zur Verfügung.

Ein weiteres Hilfsmittel bei der Suche nach der Funktion von *cib-3* ist die Charakterisierung des zugehörigen Proteins bzw. der Proteinsequenz. Die Proteinsequenz, für die das Gen *cib-3* codiert, hat keine Homologien zu Proteinen in anderen

Organismen und enthält keine bekannten Domänen, die weitere Informationen über die Genfunktion liefern. Um die Eigenschaften des Proteins weiter zu beschreiben, wurden in einem Yeast-two-Hybrid Interaktionspartner gesucht und die Expression analysiert. Das Protein CIB-3 interagiert im Yeast-two-Hybrid (siehe Kapitel 2.13, S. 61) mit sich selbst und den beiden Proteinen RACK-1 und F57F5.1 (das Gen hat eine Homologie zu Cathepsinen L). Beide Proteine sind in vielen Organismen konserviert, aber bisher ist für beide keine Funktion während der Embryonalentwicklung bekannt. RACK-1 bindet an den Midbody (Skop *et al.*, 2004) und Cathepsine L kommen allgemein in Lysosomen vor oder können die Funktion anderer Proteine aktivieren (Friedrich, 1999; Hashmi *et al.*, 2002). Die RNAi-Phänotypen zeigen, dass alle drei Gene eine Rolle für die embryonale Keimbahn spielen.

Um die Funktion von CIB-3 einzugrenzen, wurde seine Expression analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich jedoch die starke Mengenabhängigkeit von CIB-3. Die Embryonen sind sehr sensitiv gegenüber einer falschen Menge an CIB-3, so dass sie sowohl nach der Expression von zu wenig als auch von zu viel Protein sterben (siehe Kapitel 2.14, S. 68). Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein Promotor::YFP-Konstrukt in WT-Hermaphroditen transformiert. Die Expression des Konstrukts begann durch den Mechanismus des *array silencing* (Kelly *et al.*, 1997) erst im 150-Zell-Stadium.

Um die Lokalisation des Proteins CIB-3 in der frühen Embryonalentwicklung zu analysieren, wurde alternativ zu dem Promotor::YFP-Konstrukt ein CIB-3::GFP-Fusionskonstrukt in *cib-3(e2280)*-Hermaphroditen transformiert. Bei restriktiver Temperatur wurde erfolgreich auf die Expression des Proteins selektiert. Das Konstrukt wurde als Array in allen Zellen des Embryos im Cytoplasma exprimiert. Die transformierten Linien waren nur wenige Generationen stabil und die Embryonen entwickelten multiple Defekte wie ektopische Spindeln oder Zellkerne. In anderen *C. elegans*-Arbeitsgruppen wurde beobachtet, dass die Lokalisation eines Fusionsproteins von der Positionierung des Konstrukts auf einem Array oder im Genom abhängig sein kann (pers. Mitteilung Christian Eckmann und Francesca Palladino). Die Integration eines Konstrukts ins Genom ist ein zufälliges Ereignis und kann nur durch hohe Transformationsraten und sehr viel Aufwand erreicht werden. Weitere Hinweise auf die

Funktion von *cib-3* wurden deshalb mit Hilfe des Phänotyps der Mutante *cib-3(e2280)* gesammelt.

Auch *cib-3* hat eine Funktion bei der adulten Keimbahnentwicklung

In Doppelmutanten von *cib-3(e2280)* und *dpy-5(e61)* wurden Missbildungen der Gonadenarme beobachtet. Keine der beiden Mutanten entwickelt diese Missbildungen einzeln, sie sind also auf die Interaktion der beiden Gene zurückzuführen. *cib-3* hat daher eine Funktion bei der Entwicklung der adulten Keimbahn. Wahrscheinlich wirkt *cib-3* gemeinsam mit PAR-2, da ein PAR-2::GFP-Fusionsprotein in *cib-3*-Zygoten schwächer exprimiert wird und PAR-2 ebenfalls eine Funktion in der adulten Keimbahn hat (Gönczy, 2005). Außer mit PAR-2::GFP wurde das Schicksal der Zellen in *cib-3*-Embryonen mit Hilfe verschiedener Fusionsproteine analysiert.

Die Segregation von keimbahnspezifischen Proteinen ist von *cib-3* abhängig

Die Wirkung von *cib-3* ist im Gegensatz zu *cib-1* unabhängig von der Zellzyklus-Kontrolle. Die Keimbahn geht aber auch in *cib-3*-Embryonen verloren. Um die Funktion von *cib-3* in den P-Zellen zu untersuchen, wurde die Lokalisation verschiedener GFP-Fusionsproteine vor und nach symmetrischen Teilungen untersucht. Als Beispiel für einen keimbahnspezifischen Faktor wurde PIE-1::GFP (Tenenhaus *et al.*, 2001) und als Beispiel für ein somatisches Protein MEX-5::GFP (Schubert *et al.*, 2000) gewählt. PIE-1 reprimiert die Genexpression (Batchelder *et al.*, 1999; Seydoux und Dunn, 1997) und die Degradierung von P-Zell-spezifischen Proteinen (Spike und Strome, 2003) ist von MEX-5 abhängig. Im Gegensatz zu WT-Embryonen gelangen in *cib-3*-Embryonen beide Proteine bereits während der Teilung der P1-Zelle in die beiden Tochterzellen EMS und P2. Diese Verteilung ist unabhängig von der Asymmetrie der Zellteilung immer aberrant (siehe Kapitel 2.15, S. 74). Die Mutante *cib-3(e2280)* ist die einzige bekannte, in der beide Proteine in den gleichen Zellen lokalisieren. Die Folge ist der Verlust des somatischen und des Keimbahnschicksals, was zur Letalität der Embryonen führt.

Ein Prozess, der in WT-Embryonen unmittelbar vor der Zellteilung in P1 stattfindet, ist die Drehung der Spindel um 90° (Colombo *et al.*, 2003; Gotta und Ahringer, 2001; Gotta *et al.*, 2003; Rose und Kempfues, 1998). Nach der Duplikation wandern die

beiden Centrosomen auf gegenüberliegende Seiten des Zellkerns entlang der dorso-ventralen Achse. Danach werden die Centrosomen durch Mikrotubuli auf die antero-posteriore Achse gedreht. Dieser Prozess verläuft in *cib-3*-Embryonen immer normal. Durch eine Verschiebung der Spindel auf der antero-posterioren Achse wird normalerweise die EMS-Zelle größer als P2. In manchen Fällen teilt sich in *cib-3*-Embryonen die P1-Zelle symmetrisch oder sogar mit umgekehrter Polarität. In diesem Zusammenhang wird die Spindel entlang der a-p-Achse falsch positioniert. In der P1-Zelle hat *cib-3* nach der Drehung der Spindel eine Funktion bei der Segregation von Proteinen und keimbahnspezifischen Faktoren. Die Fehler bei der Positionierung der Spindel treten in der Mutante *cib-3(e2280)* wahrscheinlich abhängig von der Dosis des Proteins auf. CIB-3 ist das erste Protein, das nach der Etablierung der Polarität mit den *par*-Genen eine Funktion bei der Proteinsegregation in der Keimbahn hat.

Dies kann sicher abgeleitet werden, da die corticale Polarität der P-Zellen nicht durch *cib-3* etabliert wird. Sie ist bis zur symmetrischen Teilung normal (siehe Kapitel 2.17, S. 81). Das Fusionsprotein PAR-2::GFP wird zwar schwächer exprimiert als in WT-Embryonen, lokalisiert aber normal am posterioren Cortex. In asymmetrischen Zellteilungen wird PAR-2::GFP normal verteilt, die Segregation ist also unabhängig von PIE-1 und MEX-5. Das Fusionsprotein PAR-6::GFP bindet in *cib-3*-Embryonen normal an den anterioren Cortex und wird in die somatischen Zellen segregiert. Bis zum 4-Zell-Stadium ist die Lokalisation der PAR-Proteine unverändert, die Segregation ist ebenfalls unabhängig von PIE-1 und MEX-5. Damit gleichen bis zum 2-Zell-Stadium die *cib-3*-Embryonen den WT-Embryonen. In der P1-Zelle werden dann die beiden Proteine PIE-1 und MEX-5 nicht aufgeteilt, sondern gelangen in beide Tochterzellen. CIB-3 hat außerdem einen Einfluss auf den Prozess der Spindelpositionierung. Nur wenn es dadurch zu einer symmetrischen Zellteilung kommt, verschwindet die corticale Polarität in den beiden Tochterzellen. Sie wird wahrscheinlich nur indirekt durch die Rolle von *cib-3* bei der Spindelpositionierung beeinflusst. Zusammen mit den beiden Interaktionspartnern definiert *cib-3* einen neuen Prozess, der die Verteilung verschiedener Faktoren in der embryonalen Keimbahnentwicklung reguliert.

***cib-3* reguliert einen neuen Prozess in der embryonalen Keimbahnentwicklung**

Wie gerade diskutiert, spielt *cib-3* eine zentrale Rolle für die asymmetrischen Zellteilungen in der P-Zelllinie. Die einzige Zelle neben den P-Zellen, die sich in der frühen Embryogenese asymmetrisch teilt, ist die EMS-Zelle. In *cib-3*-Embryonen ist auch das Teilungsmuster der EMS-Zelllinie verändert, so dass die beiden Tochterzellen MS und E manchmal gleich groß sind und die gleiche Zelllinie haben. CIB-3 scheint die Spindel also nicht nur während der Zellteilungen der Keimbahnzellen, sondern auch während der asymmetrischen Teilung der EMS-Zelle zu positionieren. Eine zweite Erklärung für die aberrante Teilung in der EMS-Zelle könnte sein, dass die normale Induktion durch die P-Zelllinie (Rocheleau *et al.*, 1997; Thorpe *et al.*, 1997) nicht ausgeführt wird.

In der P-Zelllinie ist in *cib-3*-Embryonen außer den Spindelpositionen auch die Verteilung der Zellschicksale verändert. Die Proteine PIE-1 und MEX-5 werden ab dem 2-Zell-Stadium normalerweise abhängig von der Polarität des Zellcortexes durch *cib-3* asymmetrisch im Cytoplasma verteilt (siehe Abbildung 3.2). Die genaue zeitliche Koordination der verschiedenen Prozesse ermöglicht die Einordnung der Funktion von *cib-3*. Nach der Zellteilung ist in der P1-Zelle die corticale Polarität mit den PAR-Proteinen zu sehen. Danach dreht sich die Spindel, wobei die Centrosomen von an den Midbody gebundenen Mikrotubuli gedreht werden (Gotta und Ahringer, 2001). Erst nach dieser Rotation hat *cib-3* eine Funktion bei der Positionierung der Spindel entlang der antero-posterioren Achse. Gleichzeitig werden durch CIB-3 keimbahnspezifische und somatische Proteine nach anterior und posterior verteilt, um während der nächsten Zellteilung in die jeweilige Tochterzelle zu gelangen. In *cib-3*-Embryonen werden die spezifischen Proteine während der Zellteilung nicht verteilt. Nach einer symmetrischen Zellteilung wird auch die corticale Polarität nicht wieder etabliert. Damit ist *cib-3* eine zentrale Komponente für die Transmission der corticalen Polarität in eine cytoplasmatische Polarität. Diese Polarität wird für die Segregation von keimbahnspezifischen Proteinen in die P-Zelllinie benötigt.

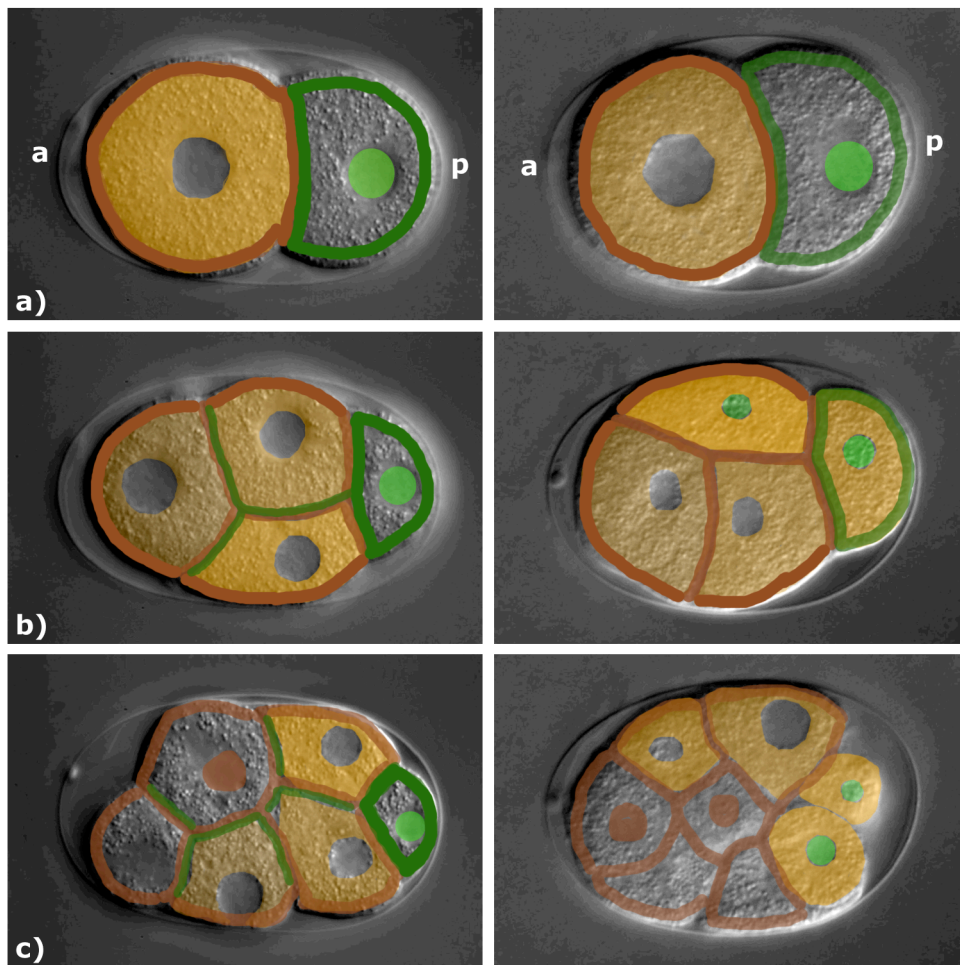


Abbildung 3.2: Die Verteilung von GFP-Fusionsproteinen in WT-Embryonen und in *cib-3*-Embryonen. Die Lokalisation verschiedener Proteine wurde in den Nomarski-Aufnahmen von ausgewählten Embryonen beispielhaft skizziert. In der linken Spalte ist ein WT-Embryo dargestellt, in der rechten ein *cib-3*-Embryo mit einer symmetrischen Teilung der P2-Zelle. a) Die Proteine sind in den 2-Zell-Stadien gleich lokalisiert. Anterior (a) und posterior (p) sind gekennzeichnet. b) Im 4-Zell-Stadium sind die beiden Proteine PIE-1 (hellgrün) und MEX-5 (orange) im *cib-3*-Embryo falsch verteilt, PAR-2::GFP (dunkelgrün) und PAR-6::GFP (braun) lokalisieren aber richtig. c) Nach der symmetrischen Teilung der P2-Zelle im *cib-3*-Embryo sind die Proteine MEX-5 und PIE-1 in beiden Tochterzellen nachweisbar und PAR-2 ist nicht detektierbar. Die Zellen E und MS sind gleich groß, genauso C und P3. Über die Lokalisation von PAR-6::GFP kann keine eindeutige Aussage gemacht werden. Die Zellkerne sind verschieden groß, da sie in verschiedenen Ebenen liegen.

Wie wirkt CIB-3?

Prinzipiell gibt es mehrere Möglichkeiten, wie *cib-3* die Verteilung der Proteine beeinflussen kann (siehe auch Gönczy, 2005). Die erste Möglichkeit ist der direkte Transport von Proteinen, der für die Segregation der P-Granulae in die Tochterzellen postuliert wurde (Hird *et al.*, 1996; Strome und Wood, 1983). Auf molekularer Ebene wurde bisher kein Prozess beschrieben, der die Segregation von Proteinen in der

Keimbahn steuert. Eine zweite Möglichkeit für eine asymmetrische Aufteilung ist eine lokale Degradierung der Proteine, wie sie z.B. für PIE-1 in somatischen Zellen gefunden wurde (Mello *et al.*, 1996). Eine dritte Möglichkeit ergibt sich durch den Einfluss von *cib-3* auf die Position der Spindel entlang der Achse. *cib-3* könnte selektiv Proteine für den Transport durch das Cytoskelett markieren. Besonders erstaunlich und neu ist, dass durch CIB-3 sowohl somatische als auch keimbahnspezifische Proteine falsch verteilt werden.

Eine Voraussetzung für die Segregation von Proteinen ist die corticale Zellpolarität, die mit der Bindung der PAR-Proteine aufgebaut wird (Kemphues, 2000; Kemphues *et al.*, 1988; Rose und Kemphues, 1998). Bisher war es eine ungelöste Frage, welche Proteine die Zellasymmetrie nach der Polarisierung des Zellcortex weiterleiten. Durch die Analyse von *cib-3* wurde eine neue Komponente identifiziert, die in einem zweiten Prozess diese Polarität ins Cytoplasma übersetzt und so die Segregation von Proteinen steuert. Ein entsprechender Prozess muss auch in anderen Organismen existieren und kann sehr konserviert sein.

3.3 *cib-2*

Das dritte Gen, das in die Gruppe der *cib*-Gene eingeordnet wurde, ist *cib-2*. Die Mutanten haben im Phänotyp sowohl Gemeinsamkeiten mit *cib-1(e2300)* als auch mit *cib-3(e2280)*. Es gibt symmetrische Zellteilungen in der P-Zelllinie und davon abhängig degradieren die P-Granulae in beiden Tochterzellen. Die ts-Phasen von Mutanten in den drei Genen sind gleich. In Mutanten des Gens *cib-2* nehmen die P-Zellen nach einer symmetrischen Teilung wie in *cib-1(e2300)* das Schicksal der somatischen Tochterzelle an. Wenn sich P1 und P2 in *cib-2*-Embryonen normal teilen, verändert sich ähnlich wie in *cib-3(e2280)* das Teilungsmuster der EMS-Zelllinie. So kann die E-Zelllinie mit der MS-Zelllinie vertauscht sein oder beide Zelllinien können das gleiche Teilungsmuster haben.

Das Gen *cib-2* wurde 2006 in diesem Labor von Henning Schmidt kloniert, daher wurden die Mutanten nur am Ende dieser Arbeit in wenigen Experimenten untersucht. Der Phänotyp der Mutanten war reproduzierbar und wurde auch nach RNAi-Experimenten beobachtet. *cib-2* hat außer der Funktion in der embryonalen Keimbahn-

entwicklung eine weitere bei der Gonadenentwicklung. Die Experimente, die für *cib-1* und *cib-3* durchgeführt wurden, wurden auch mit diesem Gen durchgeführt.

Die Funktion von *cib-2* in der Gonade unterliegt der Zellzyklus-Kontrolle

Die Mutante *cib-2(e2294)* hat neben der ts-Phase während der Embryonalentwicklung noch eine zweite, die auf eine zygotische Funktion des Gens hinweist. In dieser Phase entwickeln sich bei restriktiver Temperatur (25°C) aus L1- bzw. L2-Larven von *cib-2(e2293)* sterile Hermaphroditen. In *cib-2(e2293)* werden in der adulten Keimbahn weniger Keimzellen gebildet. Werden dagegen L4-Larven von *cib-2(e2293)* oder *cib-2(e2294)* auf die restriktive Temperatur transferiert, entwickeln sich fertile Hermaphroditen, die tote Eier legen. Nach RNAi von *atl-1* und *chk-1* in L4-Larven von *cib-2(e2294)* entwickeln sich unerwartet sterile Hermaphroditen (siehe Kapitel 2.21, S. 91). Möglicherweise wird in *cib-2(e2294)* die Zellzyklus-Kontrolle wie in *cib-1(e2300)* aktiviert.

Maternales CIB-2 ist nicht an der Segregation von Proteinen beteiligt

Bei einem Vergleich von Mutanten in dem Gen *cib-2* mit *cib-3(e2280)* wurde auch die Lokalisierung des Proteins PIE-1 analysiert (siehe Kapitel 2.21, S. 92). PIE-1 wurde in den Teilungen der P-Zellen nicht symmetrisch verteilt, sondern asymmetrisch wie in WT-Embryonen. *cib-2* hat daher an dieser Stelle keinen Einfluss auf die Verteilung von Proteinen.

Nach einem Vergleich von *cib-2* mit den beiden anderen *cib*-Genen lässt sich die Funktion des Gens bei der Keimbahnentwicklung besser eingrenzen. Im Gegensatz zu *cib-3* wurde hier für *cib-2* kein Einfluss auf die Segregation keimbahnspezifischer Proteine gefunden. Durch den *atl-1 chk-1*-RNAi zeigt sich eine Aktivierung der Zellzyklus-Kontrolle in *cib-2(e2294)* wie in *cib-1(e2300)*. Unabhängig davon verursachen Mutanten in allen drei Genen symmetrische Teilungen in der P-Zelllinie.

3.4 Die Entwicklung der embryonalen Keimbahn in *C. elegans*

In dieser Arbeit wurden neue Prozesse bei der Keimbahnentwicklung in *C. elegans* identifiziert. Mutanten in den drei Genen *cib-1*, *cib-2* und *cib-3* wurden charakterisiert und die Genfunktionen bei der embryonalen Keimbahnentwicklung beschrieben.

Abschließend sollen die Ergebnisse zusammengefasst und ein Modell postuliert werden (siehe Abbildung 3.3).

Zwei neue, essentielle Prozesse für die embryonale Keimbahnentwicklung

Ein erster Prozess (rot markiert) wird durch die Mutation in der Thymidylat-Synthase *cib-1* definiert. Die Synthese ausreichender Nukleotid-Mengen ist eine Voraussetzung für die vollständige Replikation der DNA. In diesem Zusammenhang muss es ein Kontrollsystem für die DNA-Integrität geben, das die Entwicklung einer Zelle mit beschädigter DNA in eine Keimbahnzelle verhindert. Die Nukleotidsynthese hat (auch über die Replikation) einen Einfluss auf den Zellzyklus, der in der G2-Phase von den beiden Zellzyklus-Kontroll-Kinasen *atl-1* und *chk-1* kontrolliert wird. Bei einer Störung greift die Zellzyklus-Kontrolle und die Entwicklung der embryonalen Keimbahn wird verhindert. Dieser Prozess zeigt die neue Verbindung zwischen der Nukleotid-Synthese, der Zellzyklus-Kontrolle und der Keimbahnentwicklung.

Der zweite neue Prozess (in Abbildung 3.3 blau markiert) steuert mit CIB-3 und seinen Interaktionspartnern die asymmetrische Verteilung keimbahnspezifischer Proteine im Cytoplasma. Daneben ist CIB-3 für die Positionierung der Spindel verantwortlich und beeinflusst darüber auch die corticale Zellpolarität. CIB-2 ist neben seiner maternalen Funktion in der embryonalen Keimbahn essentiell für die weitere Entwicklung der Keimzellen in den Gonaden. In diesem Zusammenhang wird in *cib-2(e2294)* die G2-Zellzyklus-Kontrolle aktiviert. Vorläufige Ergebnisse eines Yeast-two-Hybrid zeigen eine Interaktion von CIB-2 mit den beiden Interaktionspartnern von CIB-3 (gestrichelte schwarze Pfeile).

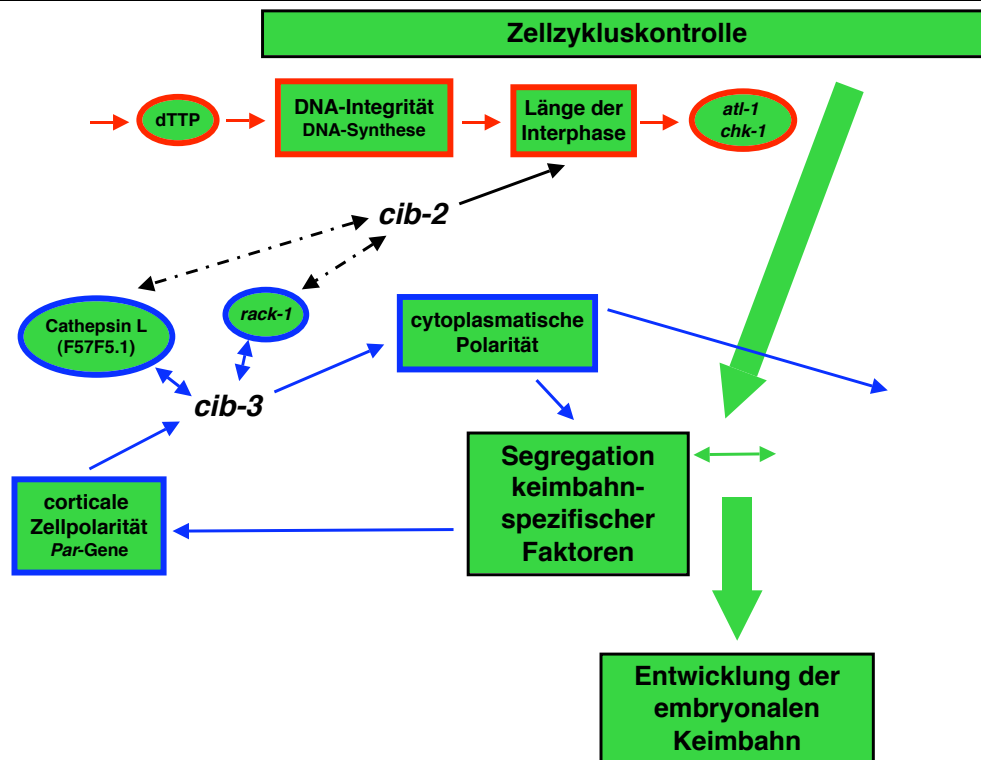


Abbildung 3.3: Die Entwicklung der embryonalen Keimbahn (grüne Pfeile) hängt in *C. elegans* von zwei Prozessen (rote und blaue Pfeile) ab, die nach der Charakterisierung der Mutanten in den Genen *cib-1* und *cib-3* neu beschrieben wurden. CIB-2 hat einen Einfluss auf die Zellzyklus-Kontrolle und interagiert nach vorläufigen Ergebnissen eines Yeast-two-Hybrid mit den gleichen Proteinen wie CIB-3 (schwarze Pfeile).

Die beiden Prozesse, die in dieser Arbeit neu definiert wurden, ermöglichen gemeinsam die Entwicklung der embryonalen Keimbahn. In anderen Organismen wurden bisher keine ähnlichen Prozesse bei der Keimbahnentwicklung beschrieben, aber auch hier ist eine Konservierung der beiden neuen Prozesse gut möglich. Die allgemeine Gültigkeit der Prinzipien könnte zum besseren Verständnis der embryonalen Keimbahnentwicklung beitragen.

4 Material und Methoden

4.1 Abkürzungsverzeichnis

AB, P usw. die Bezeichnungen für die einzelnen Blastomeren im *C. elegans*-Embryo

AS Aminosäure(n)

bp Basenpaar(e)

cM centiMorgan

cib *changed identity of blastomeres*, veränderte Identität der Blastomeren

dH₂O destilliertes Wasser

dTTP Desoxyribosethymidintriphosphat

dsRNA doppelsträngige RNA

EMS Ethylmethansulfonat

EST *expressed sequence tag*, exprimiertes Stück eines ORFs

GFP *green fluorescent protein*, grün fluoreszierendes Protein

h Stunde(n)

kb Kilobase(n)

ORF *open reading frame*, offenes Leseraster eines Gens

SNP *single nucleotide polymorphism*, Austausch eines einzelnen bp der DNA

RNAi *RNA interference*

RT Raumtemperatur

RT-PCR Polymerase-Kettenreaktion mit reverser Transkriptase

ts temperatursensitiv

üN über Nacht

WT Wildtyp

YAC *Yeast artificial chromosome*, ein künstliches Hefechromosom

4.2 Verwendete Lösungen und Medien

Für alle Lösungen werden Chemikalien von Diagonal, Sigma, Roth oder Gibco BRL verwendet.

M9-Puffer 3 g KH_2PO_4
 6 g Na_2HPO_4
 5 g NaCl
 1 ml 1 M MgSO_4 -Lösung
 auf 1.000 ml mit dH_2O auffüllen und autoklavieren

Hypochloritlösung 6 ml HOCl
 2,5 ml 5 N KOH
 auf 50 ml mit dH_2O auffüllen

PBS-Puffer 11,4 g K_2HPO_4
 6,8 g KH_2PO_4
 8,57 g NaCl
 pH 7,2 einstellen
 auf 1.000 ml mit dH_2O auffüllen und autoklavieren

PBST zu PBS-Puffer 0,5 % (v/v) Triton X-100 zugeben

PFA-PBS 0,5 g Paraformaldehyd
 0,5 ml dH_2O
 1 Tropfen 1 M NaOH
 2 bis 3 min. bei 80°C lösen
 auf 10 ml mit PBS auffüllen (evtl. pH-Wert neu einstellen)

| | |
|--|---|
| 4x TBS-Puffer | 30,26 g Tris 43,83 g NaCl pH 7,4 einstellen auf 1.000 ml mit dH ₂ O auffüllen und autoklavieren |
| TBST | zu 1x TBS-Puffer 0,25 % (v/v) Tween 20 zugeben |
| TBA-Puffer | 7 ml 1,2-Propandiol 2 g TBA (2,3-t-Butyl-4-Hydroxyanisol) 0,6 g n-Propylgallat 400 µl 0,1 M Natriumazid auf 10 ml mit dH ₂ O auffüllen, bei 4°C lagern |
| PVP | 10 mg Polyvinylpyrrolidon (Molekulargewicht 360.000) 500 µl dH ₂ O, lösen auf 100 ml mit abs. Ethanol auffüllen |
| TE-Puffer | 10 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0 einstellen auf 1.000 ml mit dH ₂ O auffüllen und autoklavieren |
| <i>Single-Worm Lysis-Puffer</i> | 50 mM KCl 10 mM TrisCl pH 8,3 2,5 mM MgCl ₂ 0,45 % (v/v) NP40 oder Triton X100 0,45 % (v/v) Tween 20 |

| | |
|--------------------------|--|
| PCIA | 25:24:1 Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol |
| 5x TBE-Puffer | 54 g Tris 27,5 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 auf 1.000 ml mit dH ₂ O auffüllen und autoklavieren |
| 50x TAE-Puffer | 242 g Tris 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA auf 1.000 ml mit dH ₂ O auffüllen und autoklavieren |
| 10x TE für Y2H | 2,42 g Tris 4 ml 0,5 M EDTA pH 7,5 einstellen auf 200 ml mit dH ₂ O auffüllen und autoklavieren |
| 10x Lithiumacetat | 13,19 g LiAc pH 7,5 einstellen auf 200 ml mit dH ₂ O auffüllen und autoklavieren |
| 50 % PEG 3350 | 100 g PEG 3350 auf 200 ml mit dH ₂ O auffüllen und autoklavieren bei Bedarf zum Lösen des PEG vor dem Autoklavieren auf 50°C erwärmen |

NGM-Medium

6 g NaCl

10 g fettes Pepton (Bacto Peptone von Difco)

29 g Agar

2 ml Cholesterin-Lösung

auf 2.000 ml auffüllen und autoklavieren, danach noch zugeben:

10 ml 0,1 M CaCl_2 10 ml 0,1 M MgSO_4

50 ml 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,0

10 ml Nystatinlösung (1 % Stammlösung)

10 ml 20 % Succrose

LB-Medium

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

15 g Agar (für Platten)

pH 7,5 einstellen

auf 1.000 ml mit dH_2O auffüllen und autoklavieren**SOB-Medium**

20 g Trypton

5 g Hefeextrakt

0,5 g NaCl

15 g Agar für Platten

10 ml 250 mM KCl

pH 7,0 einstellen

auf 1.000 ml mit dH_2O auffüllen und autoklavierennach dem Autoklavieren 10 ml steriles 2 M MgCl_2 zugeben

| | |
|----------------------------------|--|
| SOC-Medium | 970 µl SOB 20 µl sterile 1 M Glucose 10 µl steriles 2 M MgCl ₂ |
| YPD-Medium | 10 g Hefeextrakt 20 g Bacto-Pepton 20 g Agar für Platten pH 6,5 einstellen auf 900 ml mit dH ₂ O auffüllen und autoklavieren 100 ml separat autoklaviertes 20 % Glukosemonohydrat zugeben |
| SD-Medium | 6,7 g Yeast Nitrogen base (w/o AA, also ohne Aminosäuren) 25 g Agar für Platten 100 ml 10x Aminosäuremix (ohne Ade, His, Trp, und Leu) 100 ml 10x Aminosäurelösung nach Bedarf pro AS pH 5,8 einstellen auf 900 ml mit dH ₂ O auffüllen und autoklavieren danach 50 ml 40 % Glucoselösung zugeben |
| 10x Aminosäuren (einzeln) | 200 mg L-Adenin Hemisulfat 200 mg L-Histidin HCl Monohydrat 1.000 mg L-Leucin 200 mg L-Tryptophan jeweils auf 1.000 ml mit dH ₂ O auffüllen und autoklavieren |

10x Aminosäuremix

200 mg L-Adenin HCl

300 mg L-Isoleucin

300 mg L-Lysin HCl

200 mg L-Methionin

500 mg L-Phenylalanin

2.000 mg L-Threonin

300 mg L-Tyrosin

200 mg L-Uracil

1.500 mg L-Valin

auf 1.000 ml mit dH₂O auffüllen und autoklavieren

4.3 Verwendete Stämme**Bakterien**

Für diese Arbeit werden zwei verschiedene *E. coli*-Bakterienstämme verwendet. PCR-Produkte werden nach der Ligation in pCR4 TOPO mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit von Invitrogen[™] in One Shot[®] Top 10-Zellen (Genotyp: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*araleu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*) transformiert. Alle anderen Vektoren werden in DH5 α (Genotyp: F- *supE44* Δ *lacU169* (Δ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*) transformiert.

Saccharomyces cerevisiae

Für den Yeast-two-Hybrid wird das MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 der Firma Clontech mit dem *S. cerevisiae*-Stamm AH109 (James, 1996 und A. Holtz, unpublished, Genotyp: MATa, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4* Δ , *gal80* Δ , *LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*, *URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*) genutzt.

YACs und Cosmide

Verschiedene genomische DNA-Fragmente von *C. elegans* können von Dr. Alan Coulson (The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, UK) bezogen werden. Die Fragmente sind in YACs oder Cosmide kloniert und können für Komplementationstests und als Template für PCR aus den *S. cerevisiae*- und *E. coli*-Stämmen isoliert werden. Für diese Arbeit wurden folgende YACs und Cosmide verwendet: Y71F9, Y23H5, W01G6 und W03D8.

Caenorhabditis elegans

Als WT-Referenz wird der Stamm N2 verwendet, der in Bristol isoliert wurde. Für die SNP-Kartierung wird der Stamm CB4856 aus Hawaii genutzt. In unserem Labor sind aus dem N2-Stamm nach Mutagenese folgende temperatursensitive Allele isoliert worden und werden in dieser Arbeit verwendet: *cib-1(e2300)* (Schnabel und Schnabel, 1990), *cib-2(e2293)*, *cib-2(e2294)*, *cib-3(e2280)*, *t1025* und *pha-1(e2123)* (Schnabel, 1990). Außerdem werden drei nicht temperatursensitive Allele verwendet: *cib-1(e2303)* (Schnabel und Schnabel, 1990), *dpy-5(e61)* (Babity, 1988) und *egl-30(n686)* (Brundage *et al.*, 1996). Alle anderen Stämme kommen entweder direkt aus den verschiedenen Laboren oder vom *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC, Stiernagel, T., University of Minnesota, Minneapolis, USA):

- *div-1(or148)* (Encalada *et al.*, 2000)
- *div-1(t1642ts)* (Brauchle *et al.*, 2003)
- F57F5.1(*tm1759*) (Mitani, S., Tokyo Women's Medical College, Tokyo, Japan)
- AZ212 (*unc-119(ed3)* ruIs32[*unc-119(+)* *pie-1::GFP::H2B*], (Kaitna *et al.*, 2000))
- JH1327 ([*pie-1::GFP::pie-1*], (Cuenca *et al.*, 2003))
- JH1448 (axEx1125: pRF4 [*pie-1::GFP::mex-5*], (Cuenca *et al.*, 2003))
- JH1512 (axIs1137: pRF4 [*pie-1::GFP::par-6*], (Cuenca *et al.*, 2003))
- KK866 (itIs153: pRF4 [*pie-1::GFP::par-2*], (Wallenfang und Seydoux, 2000))

4.4 Haltung und Manipulation von *C. elegans*

Kultivierung von *C. elegans*

Die verschiedenen Stämme werden kultiviert wie beschrieben (Brenner, 1974; Wood, 1988). Wenn nicht anders erwähnt, werden alle Stämme bei 15°C gehalten. Die Kulturen wachsen auf NGM-Platten und ernähren sich von *E. coli* OP50. Auf den Platten können die Kulturen bis zu 3 Monate überleben, spätestens danach werden sie auf frische Platten umgesetzt. Dauerkulturen werden in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Für weitere Details und Methoden siehe auch *C. elegans: A Practical Approach* (Hope, 2000).

Kreuzungen

Kreuzungen werden vor allem für die Kartierung bzw. zur Komplementation von Mutanten angesetzt. Außerdem werden die verschiedenen Allele zweimal mit dem WT-Stamm gekreuzt, um die Mutationen in einen anderen genetischen Hintergrund zu bringen. Für jede Kreuzung werden vier L4-Hermaphroditen mit 12 bis 15 Männchen für drei Tage gekreuzt und danach die Hermaphroditen vereinzelt. Bei einer erfolgreichen Kreuzung werden je 20 bis 40 Larven der F1- und der F2-Generation vereinzelt und auf die verschiedenen Mutationen oder GFP-Expression getestet.

Auszählen von Gelegen

Um die Zahl der gelegten Eier zu bestimmen, werden 10 L4-Hermaphroditen vereinzelt und alle zwei Tage insgesamt dreimal umgesetzt. Jede Platte wird nach dem Entfernen des Hermaphroditen zwei Tage inkubiert und danach die toten Embryonen und die geschlüpften Larven gezählt. Die Experimente werden nach einer Woche mit weiteren 10 Hermaphroditen des Ausgangsstamms wiederholt, um die Reproduzierbarkeit zu prüfen.

Bestimmen der temperatursensitiven Phase

Die temperatursensitive Phase von Mutanten wird durch eine Analyse der Embryonen genau bestimmt. Dazu werden Hermaphroditen einer Mutante bei restriktiver Temperatur (25°C) gezogen. Die Hermaphroditen werden in ein mit dH₂O gefülltes Blockglas transferiert und mit einem Skalpell in der Mitte durchgeschnitten. Die

Embryonen werden isoliert und nach Stadien in 1-Zell-, 2-Zell-, 4-Zell-, 12-Zell-, 50-Zell-, 100-Zell-, 200-Zell-, Komma- und Brezel-Stadium sortiert. Für jedes Stadium werden mindestens 20 Embryonen auf eine Platte gesetzt und bei permissiver Temperatur (15°C) inkubiert. Für das umgekehrte Experiment werden Hermaphroditen bei permissiver Temperatur gezogen und die Embryonen in den verschiedenen Stadien auf die restriktive Temperatur transferiert. Nach zwei Tagen werden die toten Eier und die geschlüpften Larven ausgezählt.

Die temperatursensitive Phase wird auch in der weiteren Entwicklung bestimmt. Dazu werden von jedem Larvenstadium 20 Larven von permissiver auf restriktive Temperatur transferiert und umgekehrt. Die Larven werden für sieben Tage jeden Tag auf ihr Entwicklungsstadium kontrolliert.

Beide Experimente zur Bestimmung der ts-Phase werden nach einer Woche wiederholt, um reproduzierbare Werte zu bekommen.

Synchronisation einer *C. elegans*-Kultur

Zur Herstellung von synchronen Kulturen von *C. elegans* werden normale Kulturen mit Hypochlorit-Lösung behandelt. Dazu werden Kulturen mit vielen Hermaphroditen mit zweimal 2 ml M9-Puffer von den Platten gewaschen und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Kulturen werden 3 min. mit 5 ml Hypochlorit-Lösung geschüttelt und zentrifugiert. Dieser Vorgang wird nach zweimaligem Waschen mit M9-Puffer wiederholt, bis sich die Hermaphroditen vollständig aufgelöst haben und am Binocular nur noch die Embryonen zu sehen sind. Nach einem weiteren, doppelten Waschschrift mit M9-Puffer werden die Embryonen auf NGM-Platten verteilt. Nach der Hypochlorit-Behandlung variiert das Alter der Embryonen nur um ± 4 h. Die entstehenden Kulturen sind für eine Generation weitgehend synchron. Diese Methode ist auch geeignet, um Kontaminationen mit Bakterien und Pilzen zu entfernen.

4D-Mikroskopie und Auswertung der Embryonen

Die Entwicklung eines *C. elegans* Embryos kann mit der 4D-Mikroskopie genau analysiert werden. Am 4D-Mikroskop wird ein Embryo alle 35 s in 25 Fokusebenen aufgenommen, so dass eine 3D-Zeitrafferaufnahme (also 4D-Aufnahme) entsteht

(Bischoff, 2005; Schnabel *et al.*, 1997). Die Aufnahme kann mit entsprechender Software wie SIMI°Biocell ausgewertet werden.

Für eine Aufnahme werden Hermaphroditen mindestens über Nacht (üN) bei 25°C inkubiert. Die Hermaphroditen werden danach wie für die Bestimmung der ts-Phase in einem Blockglas mit dH₂O aufgeschnitten und die Eier aus den Gonaden isoliert. Embryonen im 1- oder 2-Zell-Stadium werden mit einer Pipette auf einen Objektträger mit einem vorbereiteten, dünnen Agarkissen aus 5 % Agar transferiert. Zwei oder mehr Embryonen werden nebeneinander gelegt und mit einem Deckglas abgedeckt. Unter das Deckglas wird zu den Embryonen gegen Austrocknen dH₂O gegeben bis 3/4 des Volumens gefüllt sind. Der verbleibende Sauerstoff reicht für die Versorgung der Embryonen aus. Das Präparat wird mit flüssiger Vaseline versiegelt, um während der Aufnahme ein Verdunsten zu verhindern.

Das Präparat wird am 4D-Mikroskop bei Nomarski-Optik aufgenommen. Als 4D-Mikroskop werden die Modelle Axioplan 1 und Axioplan 2 von Zeiss mit einem 100er Zeiss Plan-Neofluor-Objektiv zur 1,3 Öl-Immersion genutzt. Das Objektiv und der Kondensor sind über einen Kühlring und Schlauchsysteme mit einem Thermostaten verbunden, so dass das Präparat konstant temperiert wird. Mit diesem System sind auch schnelle Temperaturwechsel möglich. Ein spezielles Programm, das von Anja-Kristina Schulz und Ralf Schnabel entwickelt wurde, steuert das 4D-Mikroskop während der Aufnahme. Alle 35 s werden mit einer Kamera (von Hamamatsu oder PCO) 25 Fokusebenen im Abstand von 1 µm aufgenommen und digital gespeichert. Um neben den Nomarski-Bildern auch Fluoreszenzbilder aufzunehmen, stehen alternativ zwei Mikroskope zur Verfügung. An dem einen Mikroskop sind zwei analoge Kameras mit Framegrabber (zur Digitalisierung) montiert, zwischen denen für jede Bilderserie halbautomatisch umgeschaltet werden kann. Die erste Kamera nimmt die Nomarski-Bilder auf, die zweite ist sehr sensitiv für Fluoreszenzbilder. Die Sensitivität wird an der Kamera für jede Aufnahme manuell eingestellt. Das zweite Mikroskop ist ein 2-Kanal-4D-Mikroskop, bei dem über das Mikroskop-Steuerprogramm alle Einstellungen bis zur Belichtungszeit automatisch bedient werden können. Die Entwicklung dieser neuen Einstellungsvarianten ermöglicht in Kombination mit der digitalen Kamera am

Mikroskop besonders klare Fluoreszenzbilder. Soweit nicht anders beschrieben, werden alle Aufnahmen bei 25°C durchgeführt.

Adulte Hermaphroditen werden in 1 mM Levamisol (ein nematodenspezifischer Hemmstoff, der die Tiere paralyisiert) auf das Agarkissen präpariert, damit sie sich unter dem Mikroskop nicht mehr bewegen können. Die *cib-3*-Hermaphroditen sind bei dieser Präparation sehr empfindlich gegenüber Druck.

Die Auswertung der 4D-Aufnahmen erfolgt hauptsächlich mit Hilfe des Programms SIMI°BioCell (Schnabel *et al.*, 1997). Mit diesem Programm können alle Normarksi- und Fluoreszenzbilder der Embryonen genau analysiert werden. Die Zellkerne und Mitosen werden am Bildschirm markiert und in einer Zelllinie dargestellt. Durch einen Vergleich mit der WT-Referenz können Defekte wie verzögerte Teilungszeiten in den Embryonen leicht festgestellt werden. Eine weitere Möglichkeit, Defekte in den Embryonen zu finden, ist die manuelle Messung der Zellgrößen am Bildschirm. In den meisten Fällen sind die Tochterzellen der P-Zelllinie nach einer asymmetrischen Zellteilung eindeutig verschieden groß. In Zweifelsfällen wird der Umriss der beiden Tochterzellen in allen Ebenen auf eine Transparent-Folie übertragen. Die Umrisse werden ausgeschnitten und an einer Feinwaage gewogen. Bei gleichem Gewicht der Umrisse sind die beiden Tochterzellen gleich groß.

Färbung von Embryonen

Für Antikörperfärbungen oder Färbungen mit Farbstoffen wie DAPI werden die Embryonen auf speziellen, mit Teflon beschichteten Objektträgern fixiert.

Die Embryonen werden aus den Hermaphroditen wie für die Temperaturkurve und die 4D-Mikroskopie in einem mit dH₂O gefüllten Blockglas isoliert. Gleichzeitig wird ein spezieller Objektträger, der eine Teflonbeschichtung mit acht zylindrischen Löchern trägt, mit Poly-L-Lysin (0,25 mg/ml) beschichtet und auf einem Heizblock bei 90°C getrocknet. Die Embryonen werden in die Löcher pipettiert und kleben an dem Poly-L-Lysin fest. Ein 1,5 mm dickes Deckglas wird mit leichtem Überstand auf den Objektträger gelegt und das Präparat auf einem Metallblock, der mit flüssigem Stickstoff gekühlt wird, für 10 min. tiefgefroren. Danach wird das Deckglas mit dem Finger zügig am Überstand vom Objektträger abgeschlagen, um die Eischalen der Embryonen

aufzubrechen. Vor der Färbung werden die fixierten Embryonen entweder nur mit Methanol-Aceton oder zusätzlich mit Paraformaldehyd (PFA) permeabilisiert.

Für die Permeabilisierung mit PFA wird der Objektträger an der Wasserstrahlpumpe mit einer angeschrägten Pipettenspitze auf der Teflonbeschichtung trocken gesaugt und gleichzeitig 8 µl frisches PFA-PBS auf die Embryonen pipettiert. Das PFA-PBS wird einmal abgesaugt und erneut zugegeben. Das Präparat wird mit PFA-PBS 10 bis 15 min. im Dunkeln in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wird das PFA-PBS abgesaugt. Die Embryonen werden in jedem Fall mit Methanol und Aceton permeabilisiert. Das Präparat wird 5 min. in auf -20°C vorgekühltem Methanol inkubiert und anschließend weitere 5 min. in vorgekühltem Aceton. Danach trocknet das Präparat bei Raumtemperatur (RT) und kann entweder direkt für die Färbungen verwendet oder zur Aufbewahrung tiefgefroren werden.

Für die verschiedenen Färbungen wird das Präparat 10 min. bei RT in TBST äquilibriert. Die Teflonbeschichtung wird wie vor der Zugabe von PFA mit einer Pipettenspitze trocken gesaugt, bevor die Färbung angesetzt wird. In jedes zylindrische Loch auf dem Objektträger werden 8 µl Lösung pipettiert, wobei sich die verschiedenen Färbungen methodisch vor allem durch die Länge der Inkubation unterscheiden. Die Inkubation erfolgt für alle Färbungen in einer feuchten Kammer im Dunkeln. Für Färbungen der DNA wird das Präparat mit 5 bis 10 µg DAPI in PBS für 20 min. bei RT inkubiert. Für Antikörperfärbungen wird zuerst der primäre Antikörper zugegeben und entweder 3 bis 4 h bei RT oder üN bei 4°C inkubiert. Danach wird das Präparat für 10 min. in TBST gewaschen, um den ungebundenen primären Antikörper zu entfernen. Die Beschichtung wird vor der Zugabe von 8 µl des sekundären Antikörpers erneut trocken gesaugt. Die Inkubation wird wie für den primären Antikörper durchgeführt.

Nach den verschiedenen Färbungen wird das Präparat 10 min. bei RT in TBST gewaschen, um ungebundene Antikörper und Reagenzien zu entfernen. Die Beschichtung wird mit einer Pipettenspitze trocken gesaugt. Das Ausbleichen der Färbungen wird durch das Füllen der zylindrischen Löcher mit 8 µl TBA-Puffer verhindert. Das Präparat wird blasenfrei mit einem 1 mm dicken Deckglas abgedeckt und mit durchsichtigem Nagellack verschlossen. Die Färbungen werden am 4D-Mikroskop im Fluoreszenzkanal mit dem jeweiligen Filter ausgewertet.

Auswertung der DAPI-Färbungen am LSM

Um die Menge an DNA in den *cib-1*-Embryonen zu bestimmen, wurden die Embryonen mit DAPI gefärbt und am Laser Scanning Mikroskop (LSM 510) am Institut für Pflanzenbiologie ausgewertet. Die Auswertung erfolgte durch Intensitätsvergleiche des Fluoreszenzsignals im Zellkern und im Cytoplasma wie von Büssing (2005) beschrieben.

RNAi nach Injektion oder nach Füttern

Der Prozess des RNAi (*RNA mediated interference*, Fire *et al.*, 1998) wird genutzt, um die Menge eines Genprodukts in *C. elegans* zu reduzieren. Die doppelsträngige RNA kann mit drei grundsätzlich verschiedenen Methoden in *C. elegans* eingebracht werden.

Die erste Methode ist die Mikroinjektion von dsRNA (Herstellung siehe Kapitel 4.5, S. 138) in die Gonaden von jungen, adulten Hermaphroditen. Mit der Methode lassen sich auch andere Substanzen wie dFU und dTTP oder DNA in Form von Cosmiden und anderen Vektoren zur Transformation in *C. elegans* injizieren. Nach der Transformation mit DNA werden die Hermaphroditen wie nach der ballistischen Transformation ausgewertet (siehe 4.4, S. 129).

Für die Mikroinjektion werden neben der Zucht von jungen Hermaphroditen auch einige andere Dinge vorbereitet. Am Tag vor der Mikroinjektion werden mehrere Agarosekissen präpariert. Auf ein rundes Deckglas wird heiße 2 % Agaroselösung getropft und mit einem zweiten Deckglas flach gepresst. Nach kurzer Zeit ist das Agarosekissen fest und das obere Deckglas kann vorsichtig entfernt werden. Das fertige Kissen wird mehrere Stunden oder über Nacht auf dem Heizblock bei 80°C getrocknet. Vor der Injektion müssen auch die Injektionsnadeln vorbereitet werden. Sie werden mit dem Nadel-Zieh-Gerät BB-CH der FMI GmbH nach einem optimierten Programm aus Glaskapillaren gezogen. Die dsRNA-Lösung wird bei 13.000 rpm für 4 min. zentrifugiert, um das spätere Verstopfen der Injektionsnadel durch größere Partikel zu verhindern. 3 µl dsRNA-Lösung werden mit einer "gel loader tip" in eine Injektionsnadel pipettiert und blasenfrei in die Nadelspitze geschüttelt. Die Nadel wird in einen Mikromanipulator eingesetzt und unter dem Mikroskop (Axiovert von Zeiss) im 40x

Objektiv in der Mitte des Sehfeldes zentriert. Mit einer Mikropumpe wird ein Druck vom max. 20 psi (*pound per square inch*) zur Injektion aufgebaut.

Am besten sind junge Hermaphroditen mit 2 bis 6 Eiern zur Injektion geeignet. Um sie für die Injektion zu fixieren, werden die vorbereiteten Agarosekissen verwendet. Das Kissen wird mit einer dünnen Schicht Halocarbonöl überzogen, direkt daneben wird ein Tropfen M9-Puffer pipettiert. Ein geeigneter Hermaphrodit wird mit dem Platinspatel in den M9-Puffer gesetzt und ohne Bakterien in das Öl transferiert. Durch das Öl dehydriert der Hermaphrodit und klebt so an dem Agarosekissen. Der Hermaphrodit kann in dem Öl nur 2 bis 3 min. überleben, sonst ist die Dehydrierung zu weit fortgeschritten und nicht reversibel. Das runde Deckglas wird so in den Objekttisch des Mikroskops gelegt, dass der Hermaphrodit senkrecht zur Nadel im Sehfeld des 40er Objektiivs zentriert liegt. Die Vulva des Hermaphroditen liegt dabei gegenüber der Nadel. Die Nadel wird in die gleiche Fokusebene wie die Gonaden gesenkt und durch leichten Druck auf den Tisch in der Transitionszone der Gonade positioniert. Die dsRNA strömt frei in die Gonade und gelangt so in die Zellkerne. Es werden möglichst beide Gonadenarme injiziert. Nach der Injektion wird ein Tropfen M9-Puffer über den Hermaphroditen gegeben. Der Hermaphrodit rehydriert, löst sich von dem Agarosekissen und kann ohne Öl mit dem Platinspatel auf eine kleine Platte transferiert werden. Injizierte Hermaphroditen erholen sich gut und werden während der nächsten zwei Tage bei 25°C jeweils morgens und abends umgesetzt. Die Hermaphroditen und ihre Eier werden auf einen RNAi-Phänotyp kontrolliert. Wenn letale Embryonen beobachtet werden, wird eine 4D-Aufnahme durchgeführt und ausgewertet. Für jede verwendete dsRNA werden mindestens 10 Hermaphroditen injiziert. Um die Reproduzierbarkeit des RNAi-Experiments sicherzustellen, wird es eine Woche später mit weiteren 10 Hermaphroditen wiederholt.

Die zweite Methode, um dsRNA in *C. elegans* zu bringen, ist die sog. Fütterungsmethode (Timmons und Fire, 1998). Für diese Methode wird das zu untersuchende Gen in den Vektor L4440 kloniert. Der Vektor ist ein modifizierter BlueSkript-Vektor mit jeweils einem T7-Promotor rechts und links der Klonierungsstelle. In Bakterien wird das klonierte Gen von beiden Seiten transkribiert und dsRNA gebildet. Um den Abbau der dsRNA in den Bakterien zu verhindern, wird der Stamm HT115 (DE3) verwendet

(Fraser *et al.*, 2000). Dieser *E. coli*-Stamm ist RNaseIII-defizient und trägt eine IPTG-induzierbare T7-Polymerase. Für etwa 2/3 der Gene in *C. elegans* sind Bakterienstämme mit dem klonierten Gen erhältlich (bei *geneservice Ltd.*). Diese kommerziellen Stämme wurden in dem Labor von Julie Ahringer hergestellt (Fraser *et al.*, 2000; Kamath und Ahringer, 2003; Kamath *et al.*, 2001) und enthalten ein genomisches Fragment der Gene. Die RNAi-Wirkung dieser genomischen Fragmente ist meist geringer als die selbst klonierten cDNAs, die Bakterienstämme erleichtern aber die gleichzeitige Durchführung von mehreren Experimenten. *C. elegans* kann in jedem Stadium mit den Bakterienstämmen gefüttert werden, so dass bei dieser Methode besonders in der Larvalentwicklung andere RNAi-Phänotypen als nach der Injektion beobachtet werden.

Die Bakterien werden für 6 bis 15 h (aber nicht länger als 18 h) bei 37°C in 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gezogen. Auf einer kleinen Platte mit 25 µg/ml Ampicillin und 1 mM IPTG wird die dsRNA innerhalb von 6 h in den Bakterien induziert. Nach der Induktion werden 10 bis 20 Hermaphroditen auf die kleine Platte gesetzt und nach zwei Tagen auf eine frische kleine Platte mit dsRNA-Bakterien transferiert. Der RNAi-Phänotyp kann meist nach zwei bis drei Tagen beobachtet werden. Letale Embryonen werden am 4D-Mikroskop aufgenommen und ausgewertet.

In dieser Arbeit wurde für die folgenden Gene die Fütterungsmethode verwendet:

- *atl-1 chk-1* (der Bakterienstamm enthält beide cDNAs in dem Vektor L4440 und wurde freundlicherweise von Pierre Gönczy zur Verfügung gestellt, Brauchle *et al.*, 2003)
- *cwn-2* (W01B6.1 von *geneservice Ltd.*)
- *cib-3* (Y23H5A.3 von *geneservice Ltd.*)
- *rack-1* (K04D7.1 von *geneservice Ltd.*)
- F57F5.1 (F57F5.1 von *geneservice Ltd.*)

Die dritte Methode, um dsRNA in *C. elegans* einzubringen, ist das sogenannte *soaking* (tränken). Die Würmer werden für das *soaking* in dsRNA-Lösung gebadet. Die Methode wurde in dieser Arbeit nicht verwendet.

Ballistische Transformation von *C. elegans* mit Hilfe der Heliumkanone

Im Gegensatz zur Transformation durch Injektion (s. o.) eignet sich die ballistische Transformation mit Hilfe der Heliumkanone besonders gut, um eine hohe Transformationsrate in *C. elegans* zu erreichen (Wilm *et al.*, 1999). Für die Transformation können verschiedene DNAs eingesetzt werden, z.B. Cosmide und YACs zur Komplementation oder Fluoreszenzkonstrukte.

Für die ballistische Transformation werden etwa 2.000 Hermaphroditen (eine große Platte) mit jeweils 3 bis 10 Eiern benötigt. Um eine möglichst hohe Transformationseffizienz zu erreichen, werden synchrone Kulturen verwendet (siehe Kapitel 4.4, S. 122). Die Hermaphroditen werden mit 4 ml M9-Puffer zweimal von den Platten gewaschen und in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt. Während die Würmer sedimentieren, werden vorbereitete, kleine Platten mit einem *E. coli* OP50-Tropfen (\varnothing 8 mm) in der Mitte auf Eis vorgekühlt. Nach dem Absinken der Hermaphroditen wird der Überstand verworfen und die Wurmlösung 1:2 mit M9-Puffer verdünnt. 20 μ l der Wurmlösung werden auf jeden eiskalten OP50-Tropfen pipettiert, auf dem die Hermaphroditen in der Kälte erstarren. Vor der Transformation werden die Platten 10 min. auf Eis getrocknet, damit die Würmer nicht verrutschen können.

Parallel zu den Hermaphroditen wird auch ein Gold-DNA-Gemisch für die Transformation vorbereitet. 1 mg Goldpartikel (0,3-3 μ) wird in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß eingewogen, mit 100 μ l 50 mM Spermidinlösung gemischt und 10 s in ein Ultraschallbad gelegt. Das Gold wird mit dem Spermidin 10 min. inkubiert und ab und zu leicht gemischt. Nach der Zugabe von 16 μ g DNA wird die Lösung wieder kurz gevortext, weitere 10 min. inkubiert und ab und zu leicht gemischt. Danach wird das Gemisch mit dH₂O auf ein Volumen von 360 μ l aufgefüllt und weitere 10 min. bei gelegentlichem leichtem Mischen inkubiert. Die DNA wird zusammen mit dem Gold durch die tropfenweise Zugabe von 100 μ l 1 M CaCl₂-Lösung für 10 min. präzipitiert. Das Gefäß wird danach 15 s bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit Hilfe einer Pipette entfernt. Das Pellet wird dreimal mit 1 ml abs. Ethanol gewaschen und in 200 μ l PVP-Lösung aufgenommen. Ein Ansatz ist für 7 bis 8 Schüsse berechnet.

Für die ballistische Transformation werden 20 µl der Gold-DNA-Mischung auf ein Metallnetz aufgetragen, das in die Heliumkanone eingespannt wird. Bei 0,45 bar Unterdruck wird die Gold-DNA-Mischung mit 8 bar Helium auf eine kleine Platte mit Hermaphroditen geschossen. Nach dem Schuss wird die kleine Platte in 6 Stücke zerteilt und jedes Stück auf eine frische große Platte mit *E. coli* OP50 transferiert. Nach 1 bis 2 Wochen werden die F1- und die F2-Generation auf Transformanten getestet.

Je nach dem, welche DNA transformiert wurde, kann die Transformation auf verschiedene Weise getestet werden. Bei der Komplementation einer maternal letalen *ts*-Mutante wird 3 Tage nach der Transformation die F1-Generation spätestens als L4-Larven von permissiver auf restriktive Temperatur transferiert. Die Hermaphroditen mit der transfizierten DNA können die Mutation komplementieren und es entwickeln sich ab der F2-Generation stabile Linien, die für weitere Experimente eingesetzt werden können. Die Komplementation von Mutationen kann entweder mit der Sequenz eines Gens oder mit Cosmiden und YACs erfolgen. Bei einem generellen Test, ob die Mutation überhaupt komplementiert werden kann, wird für die Transformation genomische *C. elegans* Gesamt-DNA eingesetzt (Isolierung siehe Kapitel 4.5, S. 132). Für die Transformation mit dem *cib-3*::GFP-Fusionsprotein wird die gleiche Selektion verwendet. Die GFP-Expression ist erst in den 4D-Aufnahmen zu erkennen.

Für die Transformation mit einem YFP-Konstrukt hinter dem *cib-3*-Promotor wird die Mutante *pha-1(e2123)* verwendet (Granato *et al.*, 1994). Der Vektor pBX wird bei der Transformation cotransformiert und komplementiert die Mutation in *pha-1*. Die Mutation wirkt zygotisch letal, so dass die Hermaphroditen zur Selektion 3 bis 4 Stunden nach der Transformation auf die restriktive Temperatur gesetzt werden können. Die stabilen Linien enthalten zum großen Teil beide cotransformierte Vektoren und werden am 4D-Mikroskop ausgewertet. Die Verwendung von dem *pha-1*-Selektionssystem hat den Vorteil, dass in der 4D-Aufnahme neben der YFP-Expression kein anderes fluoreszierendes Protein exprimiert wird. In allen Fällen, in denen Embryonen ohne *pha-1(e2123)* untersucht werden und die Fluoreszenzexpression das Experiment nicht stört, stehen zwei verschiedene Vektoren für die Cotransformation zur Verfügung. In dem ersten Vektor pGK10 wird GFP unter der Kontrolle des SERCA-Promotors in allen Körpermuskelzellen exprimiert (Zwaal *et al.*, 2001). Der zweite Vektor

pPD118.33 aus dem Labor von Andy Fire trägt die Sequenz für GFP unter der Kontrolle des *myo-2*-Promotors (Moghal und Sternberg, 2003), das GFP wird in den Pharynxmuskelzellen exprimiert. Nach der Transformation werden die F1- und die F2-Generation an einem Binokular (MZIII Fluor von Leica) auf GFP-Expression kontrolliert und stabile Linien umgesetzt.

SNP-Kartierung

Die SNP-Kartierung wird genutzt, um Mutationen in *C. elegans* mit Hilfe von SNPs (*single nucleotide polymorphism*) zu kartieren. Außer dem WT-Referenzstamm N2 aus Bristol wird der Stamm CB4856 aus Hawaii verwendet. Die genomische Sequenz von CB4856 unterscheidet sich statistisch in jedem 1.400sten Basenpaar vom WT. Für die SNP-Kartierung werden Hermaphroditen eines Stammes mit der gesuchten Mutation und zwei benachbarten phänotypischen Markern mit Männchen von CB4856 gekreuzt. In der F2-Generation werden rekombinante Nachkommen vereinzelt und auf einzelne, bekannte SNPs (die auch Restriktionsschnittstellen betreffen können) untersucht. Die Auswertung der SNPs ermöglicht eine Aussage über die Position der Rekombinationsereignisse während der Kreuzung. So kann die Position der gesuchten Mutation mit Hilfe mehrerer SNPs auf molekularer Ebene genau eingegrenzt werden.

Mit der SNP-Kartierung war in dieser Arbeit der Übergang von der genetischen Karte auf die physikalische Karte möglich. *cib-3(e2280)* wurde nach Kreuzungen mit phänotypischen Markern auf dem linken Arm von Chromosom I zwischen *egl-30* und *dpy-5* kartiert. Auf der genetischen Karte des *C. elegans* Genoms liegt *egl-30(n715)* bei $-12,580 \pm 0,160$ cM und *dpy-5(e61)* bei $0,000 \pm 0,003$ cM. Beide Gene sind mittlerweile kloniert, die Sequenz des *C. elegans* Genoms ist ebenfalls bekannt (Babity, 1988; Brundage *et al.*, 1996). Es ist also möglich, die Informationen aus der genetischen Karte für die weitere Klonierung auf der DNA-Ebene umzusetzen (siehe Abbildung 2.18a, S. 49). Für den Versuch wurde der Stamm *cib-3(e2280) unc-73(e936)* mit dem Stamm CB4856 gekreuzt. In der F2-Generation konnten 271 rekombinante Unc-non-Cib Hermaphroditen isoliert werden, deren Nachkommen auf drei verifizierte SNPs untersucht wurden. 235 Rekombinationsereignisse lagen zwischen SNP 1 und SNP 2, weitere 3 zwischen SNP 2 und SNP 3. Nach dieser Kartierung liegt das Gen *cib-3* auf jeden Fall links von SNP 2 (siehe Abbildung 2.18 b, S. 49).

4.5 Molekularbiologische Methoden

Isolierung genomischer DNA aus *C. elegans* (Wickel-DNA)

Mit dieser Methode werden 50 bis 100 kb lange Fragmente genomischer DNA aus *C. elegans* isoliert. Die DNA ist nach der Isolierung sehr sauber und kann vielseitig verwendet werden. Pro *C. elegans*-Stamm werden 10 bis 15 große Platten mit gemischten Stadien eingesetzt.

Für die Isolierung werden von Platten, die mit einer dünnen Schicht 2 % Agarose überzogen sind, die Würmer mit zweimal 2 ml M9-Puffer abgespült und in 15 ml Falconröhrchen überführt. Ab hier werden alle Schritte bis zur Phenol-Extraktion bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Die Röhrchen werden 30 s bei 2.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Das Wurmpellet wird mit 4 ml M9-Puffer gewaschen und anschließend auf Eis abgekühlt. In einem frischen 15 ml Falconröhrchen werden 4 ml eiskalte 40 % Succrose-Lösung vorgelegt und mit der gemischten Wurmsuspension überschichtet. Die Bakterien werden 5 min. bei 3.000 rpm im Succrosegradienten abzentrifugiert. Die obere Phase mit den Würmern wird großzügig in ein frisches Röhrchen überführt und mit kaltem M9-Puffer aufgefüllt. Die Würmer werden für 30 s bei 2.000 rpm pelletiert und zweimal mit jeweils 2 ml M9-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift bleiben die Würmer in einem möglichst kleinen Volumen. Das Pellet wird mindestens 5 bis 10 min. oder üN bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wird eine Proteinase K-Lösung vorbereitet, die die Effizienz der Proteinase K von Qiagen erhöht, und zum Wurmpellet gegeben.

0,5 ml Proteinase K von Qiagen pro 0,1 ml Wurmpellet

10 mM Tris pH 7,5

0,5 % SDS (10 % Stammlösung)

0,5 % Triton X 100

30 mM EDTA

Der Ansatz wird für 2 bis 3 h bei 55°C inkubiert und immer wieder gut gemischt. Nach der Proteinase K-Behandlung sollte die Lösung gelblich und klar sein. Anschließend wird das gleiche Volumen an PCIA (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol) zugefügt und

vorsichtig durch Umdrehen des Röhrchens gemischt (nicht schütteln und nicht vortexen). Die Phasen werden durch 5 min. zentrifugieren bei 13.000 rpm getrennt. Das PCIA wird durch die wässrige Phase und die Interphase abgesaugt. Dieser Extraktionsschritt wird mehr als 20 Mal wiederholt, bis die Interphase verschwunden ist. Dann wird die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt und noch einmal mit PCIA extrahiert. Zum Schluss wird mit einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die wässrige Phase wird mit dem 2,5 fachen Volumen eiskalten abs. Ethanol aufgefüllt und sehr vorsichtig gemischt. Mit einer Pasteurpipette, die vorne zugeschmolzen ist, wird die präzipitierte DNA an der Phasengrenze aufgewickelt und anschließend in einem Eppendorfgefäß in 400 µl TE-Puffer (pH 8,0) gelöst. Die DNA lässt sich nicht vollständig aufwickeln. Die kürzeren Fragmente werden 15 min. bei 13.000 rpm pelletiert und genau wie die gewickelte DNA weiterbehandelt. Die kurzen Fragmente können sehr gut für PCR eingesetzt werden. Zu der gewickelten DNA wird so viel RNase gegeben, dass die Endkonzentration der Lösung 20 µg/ml beträgt. Der Ansatz wird 30 min. bei 37°C inkubiert und dann mit 0,5 ml PCIA extrahiert. Die wässrige Phase wird mit 0,5 ml Chloroform-Isoamylalkohol erneut extrahiert. Anschließend wird die DNA mit 2,5 Volumen eiskaltem abs. Ethanol nach vorsichtigem Mischen 10 min. bei 13.000 rpm pelletiert. Das getrocknete Pellet wird in 200 µl TE-Puffer üN bei 4°C gelöst.

Single-Worm Lysis

Die Methode der *Single Worm Lysis* ermöglicht die Isolierung von DNA aus wenigen Würmern. Sie wird z.B. für die SNP-Kartierung verwendet. 20 bis 50 adulte Hermaphroditen werden in 100 µl *Single-Worm Lysis*-Puffer gesammelt. Nach der Zugabe von 4 µl Proteinase K (20 mg/ml in dH₂O) wird der Ansatz 1 h bei 55°C inkubiert. Die Proteinase K wird 10 min. bei 94°C inaktiviert, danach kann die DNA direkt für eine PCR eingesetzt werden. Für längere PCR-Fragmente (> 1.000 bp) ist die DNA nicht sauber genug.

Weitere Methoden für die DNA-Isolierung

Genomische DNA wird aus *C. elegans* und *S. cerevisiae* mit den Qiagen Kits "genomic tip" 20/G und 100/G nach dem Protokoll für die Isolierung von genomischer DNA aus

Hefe isoliert. Statt der Zelllyse mit Lyticase werden die Würmer mit einem Succrose-Gradienten wie beschrieben (siehe 4.5, S. 132) von den Bakterien getrennt. Nach dem zweiten Waschschrift mit M9-Puffer werden die gesammelten Würmer in G2-Lösung überführt und mit 200 µl Glasperlen ca. 20 min. gevortext, bis unter einem Binokular keine Würmer mehr erkennbar sind. Der Ansatz wird mit 100 µl Proteinase K 2 bis 3 h bei 55°C inkubiert, um alle Zellen aufzuschließen. Danach wird die Lösung auf die äquilibrierte Säule gegeben und die DNA nach Protokoll des Herstellers isoliert.

PCR

Mit der Methode der PCR (*polymerase chain reaction*) werden mit spezifischen Primern definierte DNA-Abschnitte amplifiziert. Die PCR wird z.B. zur Klonierung von Genen aus der genomischen DNA von *C. elegans* verwendet. Das folgende Rezept bezieht sich auf den Ansatz einer PCR-Reaktion mit Taq-Polymerase von Qiagen, in manchen Ansätzen wurden in dieser Arbeit aber auch die beiden DNA-Polymerasen HerculaseTM und Pfu Turbo von Stratagene[®] verwendet.

| | |
|---------------|--------------------------------|
| 50 µl Ansatz: | 1 µl DNA |
| | 1 µl Primer I (25 pmol/µl) |
| | 1 µl Primer II (25 pmol/µl) |
| | 5 µl dNTPs (jedes dNTP a 2 mM) |
| | 5 µl 10x PCR-Puffer |
| | 37 µl dH ₂ O |
| | 0,3 µl Taq-Polymerase |

Die verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt (siehe Kapitel 6.2, S. 154). Für jeden PCR-Ansatz werden die verschiedenen Parameter wie DNA-Menge, Temperatur und Dauer der Elongationsphase optimiert. Hier wird ein Programm beispielhaft aufgeführt.

| | |
|-----------|--|
| Programm: | Deckel 105°C |
| | 2 min. bei 94°C denaturieren |
| | 30 s bei 94°C denaturieren |
| | 30 s bei 55° binden der Primer |
| | 2 min. bei 72°C elongieren |
| | die letzten drei Schritte werden 30 Mal durchgeführt |
| | 6 min. bei 72°C elongieren |
| | bei 4°C kühlen |

Zur Kontrolle wird das PCR-Produkt neben einem geeigneten Größenstandard auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen. Alle Agarosegele zur Kontrolle werden mit 0,5x TBE-Puffer angesetzt.

RT-PCR

Für die Klonierung der cDNA eines bestimmten Gens wird eine RT-PCR angesetzt. Die cDNA wird z.B. für die Herstellung von dsRNA benötigt (Anwendung siehe Kapitel 4.4, S. 126). Die RT-PCR erfolgt mit dem Kit "ProSTAR™ Ultra-HF RT-PCR System" von Stratagene®.

| | |
|-----------|---|
| 1 Ansatz: | 40 µl dH ₂ O |
| | 5 µl 10x Ultra-HF PCR Puffer |
| | 1 µl dNTP Mix (jedes dNTP a 10mM) |
| | 1 µl Primer I (25 pmol/µl) |
| | 1 µl Primer II (25 pmol/µl) |
| | 1 µl cDNA Reaktion (polyA ⁺ RNA) |
| | 1 µl Pfu Turbo Polymerase |

| | |
|-----------|--|
| Programm: | Deckel 105°C |
| | 2 min. bei 94°C denaturieren |
| | 30 s bei 94°C denaturieren |
| | 30 s bei 60°C binden der Primer |
| | 3 min. bei 68°C elongieren |
| | die letzten drei Schritte werden 40 Mal durchgeführt |
| | 6 min. bei 68°C elongieren |
| | bei 4°C kühlen |

Auf einem Agarosegel werden 3 µl des Ansatzes kontrolliert.

Klonierung

Je nach Bedarf werden zwei verschiedene Klonierungsstrategien verwendet. Frische PCR-Produkte werden mit dem Kit “TOPO TA Cloning®” von Invitrogen nach Protokoll in den Vektor “pCR®4 TOPO®” ligiert und in One Shot® *E. coli* transformiert (siehe Angaben des Herstellers). Alternativ wird das Kit “TOPO BluntEnd“ genutzt. Der Vektor pCR4 kann zur Blau-Weiß-Selektion verwendet werden.

Die umklonierten Fluoreszenz-Konstrukte werden in elektrokompetente DH5α-Zellen kloniert. Die Küvetten werden gründlich mit dH₂O gewaschen und auf Eis vorgekühlt. Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut, bevor die DNA in einem Volumen von 1 bis 2 µl zugegeben wird. Anschließend werden die Zellen mit der DNA 1 min. auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wird mit dem Gene Pulser von Bio-Rad bei 2,3 kV, 25 µF und 200 Ω durchgeführt. Danach werden die Zellen in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C geschüttelt. Wenn sich die Zellen von der Elektroporation erholt haben, werden sie auf SOB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Platten werden üN bei 37°C inkubiert, bis die Kolonien gewachsen sind.

Plasmidpräparation

Aus den gewachsenen Einzelkolonien werden die Plasmide isoliert und mit einem Restriktionsverdau kontrolliert. Für die Isolierung wird jeweils eine Einzelkolonie in

3 ml LB-Medium mit Antibiotikum üN bei 37°C angezogen. Am nächsten Morgen werden 750 µl abzentrifugiert und die Plasmid-DNA mit dem Kit "QIAprep®8 Miniprep Kit (50)" von Qiagen isoliert. Für die Kontrolle im Restriktionsverdau werden 1 bis 2 µl eingesetzt. Die Restriktionsenzyme werden entweder von Gibco BRL oder von MBI Fermentas bezogen.

Größere Mengen Plasmid-DNA werden mit dem Kit "Plasmid Midi Kit (100)" von Qiagen aus Hauptkulturen von 100 ml LB-Medium nach Protokoll des Herstellers isoliert. Für die Isolierung von Cosmiden wird der doppelte Ansatz Bakterien aufgereinigt.

Sequenzierung

Die klonierten Gene werden nach der Restriktionsanalyse von den Minipräparationen auch in der Sequenz kontrolliert. Die klonierten Fragmente werden zur Sequenzierung mit universellen Primern über PCR amplifiziert und mit dem "QIAquick PCR Purification Kit" von Qiagen aufgereinigt. Die Konzentration der DNA wird auf einem 1 % TBE-Agarosegel kontrolliert. Die Sequenzreaktion wird mit dem DNA Sequencing Kit "Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" von Applied Biosystems angesetzt und mit dem Sequenziergerät "Abi Prism 310 Genetic Analyzer" durchgeführt.

Sequenzierungsansatz :

- 2 µl 5x Sequenzierungspuffer
- 2 µl Premix
- 1 µl Primer (5 pmol/µl)
- 0,4-0,5 µg PCR-Produkt
- auf 10 µl mit dH₂O auffüllen

| | |
|-----------|---|
| Programm: | Deckel 110°C |
| | 30 s bei 96°C denaturieren |
| | 15 s bei 55°C (je nach Primer) binden des Primers |
| | 4 min. bei 60°C elongieren |
| | die drei Schritte werden 25 Mal durchgeführt |
| | bei 4°C kühlen |

Der Sequenzierungsansatz wird mit 40 µl bidestillierten H₂O aufgefüllt und mit 5 µl NaAc pH 5,2 und 125 µl abs. Ethanol bei RT präzipitiert. Das Präzipitat wird durch die Zugabe von 1 µl Dextranblau zur Lösung angefärbt und durch Zentrifugation 15 min. bei 13.000 rpm pelletiert. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet mit 125 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wird das Pellet in 12,5 µl TSR-Puffer aufgenommen und 2 min. bei 90°C denaturiert. Danach wird die Lösung in Sequenzgefäße überführt und kann für die Sequenzierung eingesetzt werden. Nach der Sequenzierung werden die Sequenzen mit den DNA-Star Programmen von Lasergene ausgewertet. Diese Programme können auch für die Auswertung von Proteinsequenzen verwendet werden.

Aufreinigung von DNA-Fragmenten

PCR-Produkte werden z.B. für die Herstellung von dsRNA nach der Amplifizierung mit dem Kit "MinElute PCR Purification Kit" von Qiagen nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Für Umklonierungen werden Restriktionansätze auf einem präparativen 1 % TAE-Agarosegel aufgetrennt und das gesuchte Fragment mit dem Kit "MinElute Gel Extraction Kit" von Qiagen nach Protokoll extrahiert. Nach der Aufreinigung wird die Menge der DNA auf einem 1 % TBE-Agarosegel kontrolliert.

Herstellung von dsRNA

Für die RNAi-Experimente (siehe Kapitel 4.4, S. 126) wird die dsRNA nach einer *in vitro*-Transkriptionsreaktion hergestellt. Für die Transkriptionsreaktion wird ein aufgereinigtes PCR-Produkt jeweils für eins der drei folgenden Systeme nach Protokoll des Herstellers eingesetzt: "RiboMaxTM Large Scale RNA Production Systems – SP6,

T3, T7“ von Promega, "MEGAscript® – SP6, T7, T3“ von Ambion oder die T3- bzw. T7-RNA-Polymerase und die rNTPs von Roche.

Nach der *in vitro*-Transkription werden die Reaktionen mit dem Kit " RNeasy MinElute Cleanup Kit" von Qiagen aufgereinigt. 1 µl der Reaktion wird für eine Kontrolle auf einem Agarosegel eingesetzt. Das Kit kann auch für die Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. elegans* verwendet werden. Zwei Reaktionsansätze der sauberen, einzelsträngigen RNA werden 30 min. bei 37°C zusammen inkubiert, damit sich die dsRNA bildet. Für den Ansatz werden die beiden Reaktionen (T7 und T3 oder SP6) 1:1 gemischt und 10 min. bei 56°C inkubiert. Anschließend bildet sich die dsRNA in 30 min. bei 37°C. Die Qualität der dsRNA wird auf einem 1,5 % TAE-Agarosegel kontrolliert. Danach wird die dsRNA für die Injektion von Hermaphroditen eingesetzt.

Klonierung von Fluoreszenzkonstrukten

Für die Fluoreszenzkonstrukte von *cib-3* werden die entsprechenden Sequenzen mit spezifischen Primern und PCR aus genomischer DNA von *C. elegans* amplifiziert und in pCR4 kloniert. Nach der Sequenzierung werden die Fragmente mit Restriktionsenzymen aus dem Vektor ausgeschnitten und über ein präparatives TAE-Gel aufgereinigt (siehe Kapitel 4.5, S. 138). Die Fragmente werden dann in den vorbereiteten Vektor pGEM3Zf⁽⁺⁾ kloniert. Für diese Arbeit wurde ein Konstrukt mit YFP hinter dem *cib-3*-Promotor und ein *cib-3*-GFP-Fusionskonstrukt hinter dem *cib-3*-Promotor hergestellt. Beide Vektoren wurden mit der ballistischen Transformation in adulte Hermaphroditen transformiert. Die Primer und Vektoren sind im Anhang dargestellt (siehe Anhang 6.2, S. 154 und 6.3, S. 157).

Yeast-two-Hybrid

Mit der Methode des Yeast-two-Hybrid (Y2H) werden Protein-Protein-Interaktionen in *S. cerevisiae* nachgewiesen. Der Y2H wird mit den Vektoren des Matchmaker Systems von Clontech und einer cDNA-Bank von DevGen durchgeführt (siehe Kapitel 2.13, S. 61 für Details). Die verwendeten Vektoren und die klonierten cDNAs sind im Anhang beschrieben (siehe Anhang 6.3, S. 157).

Transformation von *S. cerevisiae*

Die Vektoren für den Y2H werden in den Hefestamm AH109 transformiert, der die Auxotrophien Ade⁻, His⁻, Trp⁻ und Leu⁻ trägt. Der Hefestamm wird für eine hohe Transformationsrate 3 Tage bei 30°C auf YPD-Platten frisch angezogen. Mit 2 bis 3 Einzelkolonien wird eine 3 ml Vorkultur in YPD- oder SD-Medium mit den entsprechenden Aminosäuren angesetzt und 1 Tag bei 30°C geschüttelt. Von der Vorkultur wird eine zweite Vorkultur in 20 ml YPD- oder SD-Medium angesetzt und 1 Tag bei 30°C geschüttelt. 20 ml der zweiten Vorkultur werden für die Hauptkultur von 100 ml YPD- oder SD-Medium verwendet. Die Hauptkultur wächst ca. 3 h bei 30°C, bis eine OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 erreicht wird. Die Zellen werden in einem 50 ml Glasröhrchen 5 min. bei 4.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird einmal in 20 ml dH₂O gewaschen und einmal in 20 ml 1x TE/LiAc (1:1). Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden 1 h in 500 µl 1x TE/LiAc (1:1) bei 30°C unter Schütteln resuspendiert. Die Hering-Carrier-DNA (10 mg/ml) von Clontech wird 5 min. gekocht und auf Eis abgekühlt. 0,1 µg Plasmid-DNA wird mit 0,1 µg Hering-Carrier-DNA gemischt und zu 100 µl Hefezellen in ein 2 ml Eppendorfgefäß gegeben. Die Zellen werden in 600 µl PEG/TE/LiAc (8:1:1) aufgenommen, gründlich gemischt und 1 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Danach wird der Ansatz 15 min. mit 70 µl DMSO inkubiert und weitere 15 min. bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach 2 min. Abkühlen auf Eis werden die Zellen 30 s bei 13.000 rpm abzentrifugiert und in 530 µl 1x TE vorsichtig resuspendiert. Jeweils 100 µl des Transformationsansatzes werden zur Selektion einer Interaktion auf SD-Platten mit entsprechenden Aminosäuren ausplattiert und 20 µl für eine Transformationskontrolle auf SD-Platten zur Selektion der Plasmide eingesetzt. Die Platten werden 3 Tage bei 30°C inkubiert und ausgewertet.

Selektion der Y2H-Transformanten

Für den Y2H wird erst der Vektor pGBKT7-*cib-3* in AH109 transformiert und die Selektion auf SD-Platten ohne Leucin durchgeführt. In die Transformanten wird in einem zweiten Schritt entweder der Vektor pGADT7-*cib-3* oder die cDNA-Bank in pACT transformiert. Die Selektion erfolgt für die Interaktion von Proteinen auf SD-Platten ohne Leucin, Tryptophan und Histin bzw. die Transformationskontrolle auf SD-Platten ohne Leucin und Tryptophan. Zur Bestätigung der Interaktion werden die

Transformanten zusätzlich auf SD-Platten ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin transferiert.

Plasmid-DNA-Isolierung aus *S. cerevisiae*

Aus den Hefekolonien mit interagierenden Proteinen werden die Plasmide zur Analyse isoliert. Die Hefekolonie wird dazu erneut 3 Tage bei 30°C angezogen, danach werden die Zellen gesammelt und in 50 µl TE resuspendiert. Der Zellaufschluss wird nach der Zugabe von 10 µl Lyticase (5 U/µl) und gründlichem Vortexen für 1 h bei 37°C durchgeführt. Zu den Protoplasten werden 10 µl 20 % SDS gegeben und 1 min. gevortext. Der Ansatz wird 30 min. oder üN bei -20°C eingefroren.

Nach dem Auftauen wird wieder 1 min. gevortext und der Ansatz mit TE auf 200 µl aufgefüllt. Es folgt eine Phenolextraktion mit 200 µl PCIA und 5 min. vortexen. Die Phasen werden 10 min. bei 13.000 rpm getrennt und die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Die DNA wird mit 8 µl 10 M Ammoniumacetat und 500 µl abs. Ethanol 1 h bei -70°C präzipitiert. Nach 10 min. zentrifugieren bei 13.000 rpm wird der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Das trockene Pellet wird in 20 µl dH₂O aufgenommen. 10 µl der DNA werden für den Y2H mit der Methode der Elektroporation in DH5α-Zellen transformiert und die Plasmide in Minipräparationen isoliert. Diese DNA wird wieder in AH109 mit pGBKT7-*cib-3* retransformiert und die Interaktion der Proteine kontrolliert. Wenn die Interaktion eines Proteins von dem Plasmid mit CIB-3 bestätigt wird, wird die Minipräp-DNA sequenziert und ausgewertet.

4.6 Experimente zur Klonierung der Mutante *t1025*

Zur Klonierung des Gens von der interessanten Mutante *t1025* wurden verschiedene Methoden ausprobiert. Nach der Kartierung von Richard Feichtinger kann die Mutation *t1025* in einem sehr großen Bereich auf Chromosom IV nahe *bli-6* zwischen *unc-5* ($1,780 \pm 0,010$ cM) und *dpy-20* ($5,180 \pm 0,004$ cM) liegen (siehe Abbildung 4.1, S. 143, Positionen der Gene in blau). Die Positionen von *unc-5* und *dpy-20* sind beide bekannt (Clark, 1995; Leung-Hagesteijn *et al.*, 1992), *bli-6* ist jedoch bisher nicht kloniert. Der Bereich zwischen den beiden bekannten Genen umfasst 6.200 kb und enthält entsprechend viele Gene. Einige dieser Gene und ihre Funktion sind bereits beschrieben

worden. Darunter sind manche bekannt (siehe Abbildung 4.1, Positionen der Gene in rot), deren Mutanten einen ähnlichen Phänotyp zeigen wie *t1025*:

1. *csn-5* verursacht in verschiedenen RNAi-screens (Kamath und Ahringer, 2003; Simmer *et al.*, 2003) einen embryonal letalen Phänotyp. Eine Mutante mit einem Deletionsallel ist steril. Das Gen ist in Vertebraten stark konserviert zu dem Gen *COG9 signalosome complex* und kann in anderen Modellsystemen eine E3 Ubiquitin Ligase aktivieren, um so die Proteindegradation einzuleiten (Smith *et al.*, 2002).

2. *skn-1* steht für *skinhead* und ist ein Transkriptionsfaktor, der im *C. elegans* Embryo für die Spezifizierung der mesendodermalen Vorläuferzelle EMS verantwortlich ist. Mutanten sind früh embryonal letal und haben mehr Hypodermiszellen, dafür aber weniger Darm- und Pharynxmuskulzellen. Die Zellen der EMS-Zelllinie differenzieren ähnlich wie in der C-Zelllinie (Bowerman *et al.*, 1992).

3. *him-3* steht für *high incidence of males* und ist ein Homolog von HOP1 aus *S. cerevisia*, eines Bestandteils des synaptonemalen Komplexes während der Meiose. In Mutanten ist die Verteilung der Chromosomen beeinträchtigt, was zu einer verminderten Gelegetgröße und durch den Verlust eines X-Chromosoms zu einem erhöhten Vorkommen von Männchen führt (Hodgkin *et al.*, 1979).

4. *dif-1* steht für *differentiation abnormal* und codiert für ein mitochondriales Carrier-Protein. Mutanten haben weniger, nicht differenzierte Zellen und die Embryonen sterben während der Gastrulation (Ahringer, 1995).

5. *fem-3* steht für *feminization of XX and XO animals* und ist ein nematoden-spezifisches Gen, das an der Entwicklung der weiblichen Organe beteiligt ist. Mutanten sind steril oder können nur Oozyten produzieren (Hodgkin, 1986), in RNAi-Experimenten sind auch embryonal letale Embryonen beschrieben worden (Piano *et al.*, 2002).

Da die Mutante *t1025* semidominant ist, können zur Identifizierung des Gens keine Komplementationskreuzungen durchgeführt werden – genauso wenig war eine Balanzierung mit dem Balancer *nT1* erfolgreich. Stattdessen wurden die fünf beschriebenen Gene mit ähnlichem Phänotyp in der Mutante sequenziert. Eine Mutation wurde nicht gefunden.

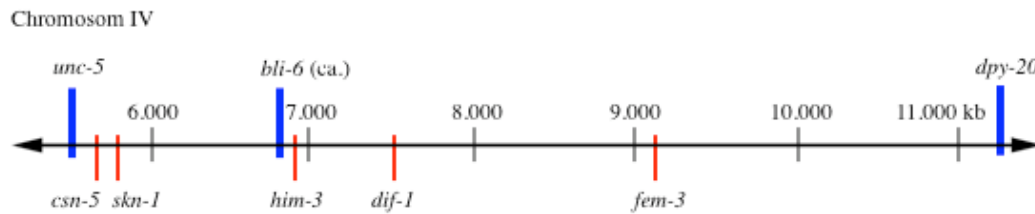


Abbildung 4.1: Position der genannten Gene zur Kartierung von *t1025* auf Chromosom IV. In blau sind die Positionen der zur Kartierung genutzten phänotypischen Marker gezeigt, rot sind Gene, deren Mutanten einen ähnlichen Phänotyp wie *t1025* zeigen.

In einem weiteren Ansatz zur Klonierung sollte die Mutante entweder mit genomischer WT-DNA oder mit YACs (siehe 4.4, S. 129) komplementiert werden. Durch die hohe Letalität der Embryonen bei 15°C ist es sehr mühsam, genügend junge Adulte für eine Transformation mit der Heliumkanone zu bekommen. Die Transformationseffizienz kann generell verbessert werden, wenn synchrone Kulturen verwendet werden (siehe Kapitel 4.4, S. 122). Auch die Synchronisation war bei diesem Stamm erschwert, da *t1025* sensitiv gegen Hypochlorit war und die Individuen einer Population durch unterschiedliche Wachstumsverzögerungen sehr heterogen wuchsen. In Vorexperimenten wurde die Transformationseffizienz von pPD118.33 als Kontrollvektor in die Mutante *t1025* getestet (siehe Tabelle 4.1). Auf dem Kontrollvektor liegt die Sequenz für GFP unter der Kontrolle des Promotors von *myo-2*, der spezifisch im Pharynxmuskel angeschaltet wird. Es war im Gegensatz zum WT bei der Mutante *t1025* nicht möglich, mit dieser Methode stabil transformierte Würmer zu bekommen.

| Transformationen | Anzahl GFP positiver (F1) | Anzahl der stabil transformierten (F2) |
|-----------------------|---------------------------|--|
| 2 (in WT) | 112 | 2 |
| 24 (in <i>t1025</i>) | 2 | 0 |

Tabelle 4.1: Transformationseffizienz des Kontrollvektors pPD118.33 mit der Heliumkanone in WT und in *t1025*. Mit dieser Methode war die Mutante nicht stabil transformierbar, wahrscheinlich starben die wenigen transformierten Würmer durch die hohe Letalität der Mutante aus.

Da bei der Mutante *t1025* durch die extrem schlechten Wachstumsbedingungen drei verschiedene Klonierungsansätze keine neuen Informationen über die Position des Gens ergaben, wurde von weiteren Experimenten abgesehen.

5 Literaturverzeichnis

- Abraham, R. T.** (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* **15**, 2177-96.
- Ahringer, J.** (1995). Embryonic tissue differentiation in *Caenorhabditis elegans* requires *dif-1*, a gene homologous to mitochondrial solute carriers. *Embo J* **14**, 2307-16.
- Alberts, B., Bray, B., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D.** (1995). Molekularbiologie der Zelle. *VCH 3. Auflage*.
- Babity, J. M. a. R., A.M.** (1988). molecular cloning of *dpy-5*. *Worm Breeder's Gazette* **10**, 53.
- Badenschier, F.** (09. Mai 2007). Kleines Forschungsgebiet sorgt für großes Brimborium. In *Spiegel online*
- Basham, S. E. and Rose, L. S.** (1999). Mutations in *ooc-5* and *ooc-3* disrupt oocyte formation and the reestablishment of asymmetric PAR protein localization in two-cell *Caenorhabditis elegans* embryos. *Dev Biol* **215**, 253-63.
- Batchelder, C., Dunn, M. A., Choy, B., Suh, Y., Cassie, C., Shim, E. Y., Shin, T. H., Mello, C., Seydoux, G. and Blackwell, T. K.** (1999). Transcriptional repression by the *Caenorhabditis elegans* germ-line protein PIE-1. *Genes Dev* **13**, 202-12.
- Berg, J. M., Tymoczko, J.L. and Stryer, L.** (2003). Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag 5. Auflage*.
- Bischoff, M.** (2005). Musterbildung in *Caenorhabditis elegans*: Zellfokussierung und embryonale Polarität. *Dissertation*.
- Bowerman, B., Eaton, B. A. and Priess, J. R.** (1992). *skn-1*, a maternally expressed gene required to specify the fate of ventral blastomeres in the early *C. elegans* embryo. *Cell* **68**, 1061-75.
- Boxem, M., Srinivasan, D. G. and van den Heuvel, S.** (1999). The *Caenorhabditis elegans* gene *ncc-1* encodes a cdc2-related kinase required for M phase in meiotic and mitotic cell divisions, but not for S phase. *Development* **126**, 2227-39.
- Boxem, M. and van den Heuvel, S.** (2001). *lin-35* Rb and *cki-1* Cip/Kip cooperate in developmental regulation of G1 progression in *C. elegans*. *Development* **128**, 4349-59.
- Brauchle, M., Baumer, K. and Gonczy, P.** (2003). Differential activation of the DNA replication checkpoint contributes to asynchrony of cell division in *C. elegans* embryos. *Curr Biol* **13**, 819-27.
- Brenner, S.** (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.
- Brodigan, T. M., Liu, J., Park, M., Kipreos, E. T. and Krause, M.** (2003). Cyclin E expression during development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **254**, 102-15.
- Brundage, L., Avery, L., Katz, A., Kim, U. J., Mendel, J. E., Sternberg, P. W. and Simon, M. I.** (1996). Mutations in a *C. elegans* Gqalpha gene disrupt movement, egg laying, and viability. *Neuron* **16**, 999-1009.
- Büssing, I.** (2005). SUMO: Zelllinienabhängige nukleäre Lokalisation des Transkriptionsrepressors PIE-1 in *Caenorhabditis elegans*. *Dissertation*, S. 37 ff.

- Carlson, C. A., Stewart, G. J. and Ingraham, J. L.** (1985). Thymidine salvage in *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas aeruginosa* provided by heterologous expression of *Escherichia coli* thymidine kinase gene. *J Bacteriol* **163**, 291-5.
- Clark, D. V., Suleman, D.S., Beckenbach K.A., Gilchrist, E.J., Baillie, D.L.** (1995). Molecular Cloning and characterization of the *dpy-20* gene of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and General Genetics* **247**.
- Colombo, K., Grill, S. W., Kimple, R. J., Willard, F. S., Siderovski, D. P. and Gonczy, P.** (2003). Translation of polarity cues into asymmetric spindle positioning in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Science* **300**, 1957-61.
- Croze, E., Usacheva, A., Asarnow, D., Minshall, R. D., Perez, H. D. and Colamonici, O.** (2000). Receptor for activated C-kinase (RACK-1), a WD motif-containing protein, specifically associates with the human type I IFN receptor. *J Immunol* **165**, 5127-32.
- Cuenca, A. A., Schetter, A., Aceto, D., Kempfues, K. and Seydoux, G.** (2003). Polarization of the *C. elegans* zygote proceeds via distinct establishment and maintenance phases. *Development* **130**, 1255-65.
- Dan, K. and Ikeda, M.** (1971). On the system controlling the time for micromere formation in sea urchin embryos. *Dev Growth Differ* **13**, 285-301.
- Dasso, M. and Newport, J. W.** (1990). Completion of DNA replication is monitored by a feedback system that controls the initiation of mitosis in vitro: studies in *Xenopus*. *Cell* **61**, 811-23.
- Delattre, M., Leidel, S., Wani, K., Baumer, K., Bamat, J., Schnabel, H., Feichtinger, R., Schnabel, R. and Gonczy, P.** (2004). Centriolar SAS-5 is required for centrosome duplication in *C. elegans*. *Nat Cell Biol* **6**, 656-64.
- Eder, C.** (1990). genetische und phänotypische Analyse des Gens *cib-2* von *Caenorhabditis elegans*. *Diplomarbeit*.
- Edgar, L. G. and McGhee, J. D.** (1988). DNA synthesis and the control of embryonic gene expression in *C. elegans*. *Cell* **53**, 589-99.
- Eisenmann, D. M.** (2005). Wnt signaling. *WormBook, The C. elegans Research Community, WormBook* doi/10.1895.
- Ellis, H. M. and Horvitz, H. R.** (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44**, 817-29.
- Encalada, S. E., Martin, P. R., Phillips, J. B., Lyczak, R., Hamill, D. R., Swan, K. A. and Bowerman, B.** (2000). DNA replication defects delay cell division and disrupt cell polarity in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Dev Biol* **228**, 225-38.
- Fay, D. S. and Han, M.** (2000). Mutations in *cye-1*, a *Caenorhabditis elegans* cyclin E homolog, reveal coordination between cell-cycle control and vulval development. *Development* **127**, 4049-60.
- Feichtinger, R.** (1990). Analyse der Entwicklungsgene *cib-3* und *zyg-11* in *Caenorhabditis elegans*. *Diplomarbeit*.
- Fields, S. and Song, O.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-6.

- Finer-Moore, J. S., Santi, D. V. and Stroud, R. M.** (2003). Lessons and conclusions from dissecting the mechanism of a bisubstrate enzyme: thymidylate synthase mutagenesis, function, and structure. *Biochemistry* **42**, 248-56.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
- Fraser, A. G., Kamath, R. S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M. and Ahringer, J.** (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* **408**, 325-30.
- Friedrich, B.** (1999). Cathepsine B, H, L und ihre Inhibitoren im Gewebe und in Zellkulturen der Prostata. *Dissertation*.
- Goldstein, B. and Hird, S. N.** (1996). Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **122**, 1467-74.
- Gönczy, P. a. Rose, L.S.** (2005). Asymmetric cell division and axis formation in the embryo. *WormBook, The C. elegans Research Community, WormBook doi/10.1895, wormbook.1.30.1*.
- Gotta, M. and Ahringer, J.** (2001). Axis determination in *C. elegans*: initiating and transducing polarity. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 367-73.
- Gotta, M., Dong, Y., Peterson, Y. K., Lanier, S. M. and Ahringer, J.** (2003). Asymmetrically distributed *C. elegans* homologs of AGS3/PINS control spindle position in the early embryo. *Curr Biol* **13**, 1029-37.
- Granato, M., Schnabel, H. and Schnabel, R.** (1994). *pha-1*, a selectable marker for gene transfer in *C. elegans*. *Nucleic Acids Res* **22**, 1762-3.
- Greene, E. A., Codomo, C. A., Taylor, N. E., Henikoff, J. G., Till, B. J., Reynolds, S. H., Enns, L. C., Burtner, C., Johnson, J. E., Odden, A. R. et al.** (2003). Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in Arabidopsis. *Genetics* **164**, 731-40.
- Greenstein, D.** (2005). Control of oocyte meiotic maturation and fertilisation. *WormBook, The C. elegans Research Community, WormBook doi/10.1895*.
- Guan, K., Nayernia, K., Maier, L. S., Wagner, S., Dressel, R., Lee, J. H., Nolte, J., Wolf, F., Li, M., Engel, W. et al.** (2006). Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* **440**, 1199-203.
- Hamilton, L. C. and Wright, J. M.** (1999). Isolation of Complementary DNAs Coding for a Receptor for Activated C Kinase (RACK) from Zebrafish (*Danio rerio*) and Tilapia (*Oreochromis niloticus*): Constitutive Developmental and Tissue Expression. *Mar Biotechnol (NY)* **1**, 279-285.
- Hansen, D. and Schedl, T.** (2006). The regulatory network controlling the proliferation-meiotic entry decision in the *Caenorhabditis elegans* germ line. *Curr Top Dev Biol* **76**, 185-215.
- Hashmi, S., Britton, C., Liu, J., Guiliano, D. B., Oksov, Y. and Lustigman, S.** (2002). Cathepsin L is essential for embryogenesis and development of *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **277**, 3477-86.

- Hird, S. N., Paulsen, J. E. and Strome, S.** (1996). Segregation of germ granules in living *Caenorhabditis elegans* embryos: cell-type-specific mechanisms for cytoplasmic localisation. *Development* **122**, 1303-12.
- Hird, S. N. and White, J. G.** (1993). Cortical and cytoplasmic flow polarity in early embryonic cells of *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* **121**, 1343-55.
- Hochedlinger, K. and Jaenisch, R.** (2006). Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature* **441**, 1061-7.
- Hodgkin, J.** (1986). Sex determination in the nematode *C. elegans*: analysis of *tra-3* suppressors and characterization of *fem* genes. *Genetics* **114**, 15-52.
- Hodgkin, J.** (2005). Introduction to genetics and genomics. *WormBook, The C. elegans Research Community, WormBook* doi/10.1895.
- Hodgkin, J. and Herman, R. K.** (1998). Changing styles in *C. elegans* genetics. *Trends Genet* **14**, 352-7.
- Hodgkin, J., Horvitz, H. R. and Brenner, S.** (1979). Nondisjunction Mutants of the Nematode CAENORHABDITIS ELEGANS. *Genetics* **91**, 67-94.
- Hong, Y., Roy, R. and Ambros, V.** (1998). Developmental regulation of a cyclin-dependent kinase inhibitor controls postembryonic cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **125**, 3585-97.
- Hope, I. A. e.** (2000). *C. elegans: A pratical Approach*. Oxford University Press.
- Hutter, H. and Schnabel, R.** (1994). *glp-1* and inductions establishing embryonic axes in *C. elegans*. *Development* **120**, 2051-64.
- Hutter, H. and Schnabel, R.** (1995a). Establishment of left-right asymmetry in the *Caenorhabditis elegans* embryo: a multistep process involving a series of inductive events. *Development* **121**, 3417-24.
- Hutter, H. and Schnabel, R.** (1995b). Specification of anterior-posterior differences within the AB lineage in the *C. elegans* embryo: a polarising induction. *Development* **121**, 1559-68.
- Hyman, A. A. and White, J. G.** (1987). Determination of cell division axes in the early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* **105**, 2123-35.
- Ishizuka, S., Martin, K., Booth, C., Potten, C. S., de Murcia, G., Burkle, A. and Kirkwood, T. B.** (2003). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a survival factor for radiation-exposed intestinal epithelial stem cells in vivo. *Nucleic Acids Res* **31**, 6198-205.
- James, P., Haliaday, J. & Craig, E. A.** (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.
- Kaitna, S., Mendoza, M., Jantsch-Plunger, V. and Glotzer, M.** (2000). Incenp and an aurora-like kinase form a complex essential for chromosome segregation and efficient completion of cytokinesis. *Curr Biol* **10**, 1172-81.
- Kamath, R. S. and Ahringer, J.** (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* **30**, 313-21.

- Kamath, R. S., Fraser, A. G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M. et al.** (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **421**, 231-7.
- Kamath, R. S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A. G. and Ahringer, J.** (2001). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* **2**, RESEARCH0002.
- Kaneda, S., Nalbantoglu, J., Takeishi, K., Shimizu, K., Gotoh, O., Seno, T. and Ayusawa, D.** (1990). Structural and functional analysis of the human thymidylate synthase gene. *J Biol Chem* **265**, 20277-84.
- Kawasaki, I., Amiri, A., Fan, Y., Meyer, N., Dunkelbarger, S., Motohashi, T., Karashima, T., Bossinger, O. and Strome, S.** (2004). The PGL family proteins associate with germ granules and function redundantly in *Caenorhabditis elegans* germline development. *Genetics* **167**, 645-61.
- Kelly, W. G., Xu, S., Montgomery, M. K. and Fire, A.** (1997). Distinct requirements for somatic and germline expression of a generally expressed *Caenorhabditis elegans* gene. *Genetics* **146**, 227-38.
- Kemphues, K.** (2000). PARsing embryonic polarity. *Cell* **101**, 345-8.
- Kemphues, K. J., Priess, J. R., Morton, D. G. and Cheng, N. S.** (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* **52**, 311-20.
- Kemphues, K. J., Wolf, N., Wood, W. B. and Hirsh, D.** (1986). Two loci required for cytoplasmic organization in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **113**, 449-60.
- Kimelman, D., Kirschner, M. and Scherson, T.** (1987). The events of the midblastula transition in *Xenopus* are regulated by changes in the cell cycle. *Cell* **48**, 399-407.
- Leung-Hagesteijn, C., Spence, A. M., Stern, B. D., Zhou, Y., Su, M. W., Hedgecock, E. M. and Culotti, J. G.** (1992). UNC-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type 1 domains, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Cell* **71**, 289-99.
- Mango, S. E., Lambie, E. J. and Kimble, J.** (1994). The *pha-4* gene is required to generate the pharyngeal primordium of *Caenorhabditis elegans*. *Development* **120**, 3019-31.
- Mello, C. C., Draper, B. W., Krause, M., Weintraub, H. and Priess, J. R.** (1992). The *pie-1* and *mex-1* genes and maternal control of blastomere identity in early *C. elegans* embryos. *Cell* **70**, 163-76.
- Mello, C. C., Schubert, C., Draper, B., Zhang, W., Lobel, R. and Priess, J. R.** (1996). The PIE-1 protein and germline specification in *C. elegans* embryos. *Nature* **382**, 710-2.
- Moghal, N. and Sternberg, P. W.** (2003). A component of the transcriptional mediator complex inhibits RAS-dependent vulval fate specification in *C. elegans*. *Development* **130**, 57-69.

- Munro, E., Nance, J. and Priess, J. R.** (2004). Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport PAR proteins to establish and maintain anterior-posterior polarity in the early *C. elegans* embryo. *Dev Cell* **7**, 413-24.
- Nusslein-Volhard, C., Lohs-Schardin, M., Sander, K. and Cremer, C.** (1980). A dorso-ventral shift of embryonic primordia in a new maternal-effect mutant of *Drosophila*. *Nature* **283**, 474-6.
- Piano, F., Schetter, A. J., Morton, D. G., Gunsalus, K. C., Reinke, V., Kim, S. K. and Kemphues, K. J.** (2002). Gene clustering based on RNAi phenotypes of ovary-enriched genes in *C. elegans*. *Curr Biol* **12**, 1959-64.
- Pichler, S., Gonczy, P., Schnabel, H., Pozniakowski, A., Ashford, A., Schnabel, R. and Hyman, A. A.** (2000). OOC-3, a novel putative transmembrane protein required for establishment of cortical domains and spindle orientation in the P(1) blastomere of *C. elegans* embryos. *Development* **127**, 2063-73.
- Priess, J. R. and Thomson, J. N.** (1987). Cellular interactions in early *C. elegans* embryos. *Cell* **48**, 241-50.
- Raff, J. W. and Glover, D. M.** (1989). Centrosomes, and not nuclei, initiate pole cell formation in *Drosophila* embryos. *Cell* **57**, 611-9.
- Reese, K. J., Dunn, M. A., Waddle, J. A. and Seydoux, G.** (2000). Asymmetric segregation of PIE-1 in *C. elegans* is mediated by two complementary mechanisms that act through separate PIE-1 protein domains. *Mol Cell* **6**, 445-55.
- Rhind, N. and Russell, P.** (2000). Chk1 and Cds1: linchpins of the DNA damage and replication checkpoint pathways. *J Cell Sci* **113** (Pt 22), 3889-96.
- Rocheleau, C. E., Downs, W. D., Lin, R., Wittmann, C., Bei, Y., Cha, Y. H., Ali, M., Priess, J. R. and Mello, C. C.** (1997). Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. *Cell* **90**, 707-16.
- Rose, L. S. and Kemphues, K. J.** (1998). Early patterning of the *C. elegans* embryo. *Annu Rev Genet* **32**, 521-45.
- Rual, J. F., Ceron, J., Koreth, J., Hao, T., Nicot, A. S., Hirozane-Kishikawa, T., Vandenhaute, J., Orkin, S. H., Hill, D. E., van den Heuvel, S. *et al.*** (2004). Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library. *Genome Res* **14**, 2162-8.
- Schmittwolf, C., Kirchhof, N., Jauch, A., Durr, M., Harder, F., Zenke, M. and Muller, A. M.** (2005). *In vivo* haematopoietic activity is induced in neurosphere cells by chromatin-modifying agents. *Embo J* **24**, 554-66.
- Schnabel, H., Bauer, G. and Schnabel, R.** (1991). Suppressors of the organ-specific differentiation gene *pha-1* of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **129**, 69-77.
- Schnabel, H. a. Schnabel, R.** (1990). An organ-specific differentiation gene, *pha-1*, from *Caenorhabditis elegans*. *Science* **250**.
- Schnabel, R.** (1995). Duels without obvious sense: counteracting inductions involved in body wall muscle development in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Development* **121**, 2219-32.

- Schnabel, R., Hutter, H., Moerman, D. and Schnabel, H.** (1997). Assessing normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D microscope: variability of development and regional specification. *Dev Biol* **184**, 234-65.
- Schnabel, R. and Schnabel, H.** (1990). Early determination in the *C. elegans* embryo: a gene, *cib-1*, required to specify a set of stem-cell-like blastomeres. *Development* **108**, 107-19.
- Schubert, C. M., Lin, R., de Vries, C. J., Plasterk, R. H. and Priess, J. R.** (2000). MEX-5 and MEX-6 function to establish soma/germline asymmetry in early *C. elegans* embryos. *Mol Cell* **5**, 671-82.
- Seydoux, G. and Dunn, M. A.** (1997). Transcriptionally repressed germ cells lack a subpopulation of phosphorylated RNA polymerase II in early embryos of *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Development* **124**, 2191-201.
- Shackleford, G. M., Shivakumar, S., Shiue, L., Mason, J., Kenyon, C. and Varmus, H. E.** (1993). Two wnt genes in *Caenorhabditis elegans*. *Oncogene* **8**, 1857-64.
- Shelton, C. A. and Bowerman, B.** (1996). Time-dependent responses to *glp-1*-mediated inductions in early *C. elegans* embryos. *Development* **122**, 2043-50.
- Simmer, F., Moorman, C., van der Linden, A. M., Kuijk, E., van den Berghe, P. V., Kamath, R. S., Fraser, A. G., Ahringer, J. and Plasterk, R. H.** (2003). Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive *rrf-3* strain reveals novel gene functions. *PLoS Biol* **1**, E12.
- Skop, A. R., Liu, H., Yates, J., 3rd, Meyer, B. J. and Heald, R.** (2004). Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms. *Science* **305**, 61-6.
- Smith, P., Leung-Chiu, W. M., Montgomery, R., Orsborn, A., Kuznicki, K., Gressman-Coberly, E., Mutapcic, L. and Bennett, K.** (2002). The GLH proteins, *Caenorhabditis elegans* P granule components, associate with CSN-5 and KGB-1, proteins necessary for fertility, and with ZYX-1, a predicted cytoskeletal protein. *Dev Biol* **251**, 333-47.
- Sonnichsen, B., Koski, L. B., Walsh, A., Marschall, P., Neumann, B., Brehm, M., Alleaume, A. M., Artelt, J., Bettencourt, P., Cassin, E. et al.** (2005). Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **434**, 462-9.
- Spike, C. A. and Strome, S.** (2003). Germ plasm: protein degradation in the soma. *Curr Biol* **13**, R837-9.
- Stinchcomb, D. T., Shaw, J. E., Carr, S. H. and Hirsh, D.** (1985). Extrachromosomal DNA transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* **5**, 3484-96.
- Strome, S. and Wood, W. B.** (1983). Generation of asymmetry and segregation of germ-line granules in early *C. elegans* embryos. *Cell* **35**, 15-25.
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. and Thomson, J. N.** (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **100**, 64-119.
- Takeishi, K., Kaneda, S., Ayusawa, D., Shimizu, K., Gotoh, O. and Seno, T.** (1985). Nucleotide sequence of a functional cDNA for human thymidylate synthase. *Nucleic Acids Res* **13**, 2035-43.

- Tenenhaus, C., Subramaniam, K., Dunn, M. A. and Seydoux, G.** (2001). PIE-1 is a bifunctional protein that regulates maternal and zygotic gene expression in the embryonic germ line of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* **15**, 1031-40.
- Thorpe, C. J., Schlesinger, A., Carter, J. C. and Bowerman, B.** (1997). Wnt signaling polarizes an early *C. elegans* blastomere to distinguish endoderm from mesoderm. *Cell* **90**, 695-705.
- Timmons, L. and Fire, A.** (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**, 854.
- van den Heuvel, S.** (2005). Cell-cycle regulation. *WormBook, The C. elegans Research Community, WormBook* doi/10.1895, wormbook.1.28.1.
- Wallenfang, M. R. and Seydoux, G.** (2000). Polarization of the anterior-posterior axis of *C. elegans* is a microtubule-directed process. *Nature* **408**, 89-92.
- Wang, S., Chen, J. Z., Zhang, Z., Gu, S., Ji, C., Tang, R., Ying, K., Xie, Y. and Mao, Y.** (2003). Cloning, expression and genomic structure of a novel human GNB2L1 gene, which encodes a receptor of activated protein kinase C (RACK). *Mol Biol Rep* **30**, 53-60.
- Wilm, T., Demel, P., Koop, H. U., Schnabel, H. and Schnabel, R.** (1999). Ballistic transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **229**, 31-5.
- Winska, P., Golos, B., Ciesla, J., Zielinski, Z., Fraczyk, T., Walajtys-Rode, E. and Rode, W.** (2005). Developmental arrest in *Caenorhabditis elegans* dauer larvae causes high expression of enzymes involved in thymidylate biosynthesis, similar to that found in *Trichinella* muscle larvae. *Parasitology* **131**, 247-54.
- Wood, W. B.** (1988). The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Wu, Y. C., Stanfield, G. M. and Horvitz, H. R.** (2000). NUC-1, a *Caenorhabditis elegans* DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis. *Genes Dev* **14**, 536-48.
- Yanowitz, J. and Fire, A.** (2005). Cyclin D involvement demarcates a late transition in *C. elegans* embryogenesis. *Dev Biol* **279**, 244-51.
- Zwaal, R. R., Van Baelen, K., Groenen, J. T., van Geel, A., Rottiers, V., Kaletta, T., Dode, L., Raeymaekers, L., Wuytack, F. and Bogaert, T.** (2001). The sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase is required for development and muscle function in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **276**, 43557-63.
- <http://expasy.org/sprot/>
- <http://www.clontech.com/>
- <http://www.ethikrat.org/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>
- <http://www.shigen.nig.ac.jp/c.elegans/index.jsp>
- <http://www.wormbase.org>

6 Anhang

6.1 Tabelle RNAi-Experimente zur Klonierung von *cib-3*

| ORF | Homologie zu | RNAi- Phänotyp |
|--------------------|--|--------------------------|
| Y23H5A.4 | tRNA- Synthetase | WT |
| Y23H5A.5a (vorne) | α -Catenin | WT |
| Y23H5A.5a (hinten) | α -Catenin | WT |
| F40E3.5 | Ser-/Thr-Phosphatase | WT |
| Y71F9B.5b | <i>lin-17</i> | WT |
| Y71F9B.16 | splicing factor similar to dnaJ | WT |
| Y71F9B.6 | cdk3 binding protein ik-3 | WT |
| Y71F9B.4 | SM protein G | 100% embryonal lethal |
| Y71F9B.3 | Polyposis locus protein 1 homolog | WT |
| Y71F9B.2 | Sacch. essentiell, proline transporter helper Candida | WT |
| Y71F9B.8 | tartan | WT |
| Y71F9B.7 | polo-like kinase 2 | WT |
| Y71F9B.9 | Lambda-Crystallin | WT |
| Y71F9B.10b | <i>sop-3</i> (suppressor of <i>pal-1</i>) | WT |
| Y71F9B.10a | hypoth. <i>C. elegans</i> , integrin beta-3 subunit | 100% embryonal lethal |
| Y71F9B.1 | Toll-like receptor <i>tol-1</i> | WT |
| Y71F9B.13 | hypoth. <i>C. elegans</i> | WT |
| Y71F9B.14 | hypoth. <i>C. elegans</i> | 100% embryonal lethal |

Tabelle 6.1: In den RNAi-Experimenten zur Klonierung von *cib-3* untersuchte Gene. Nur drei Gene zeigten einen RNAi-Phänotyp.

6.2 Primer

Primer für Experimente mit *cib-3*

cib-3 Primer für das komplementierende genomische Fragment

CE 1716 TGTTTTCCTGGCATTCTACTTCC

CE 1717 GAGCTGCCTTCTTCCATCTAAAAA

weitere Primer zur Sequenzierung

CE 1718 AAGAAGCGAGCCGATTTGAGAG

CE 1719 GTCAGGGATTGCTCTACGATAACT

CE 1720 CACGCCGAAGAAGAGCCGAGAGGT

CE 1901 GTCGCATTTGTTGATTTGGTCGTG

cib-3 Primer zur Amplifizierung der cDNA für die Yeast-two-Hybrid-Vektoren

CE 1854 ATGGTACCCATATGGTTGCCCATCAGAAGGCGGATTT

CE 1855 ATGTCGACAGAGGAGACTTTCGAAAGTCTGATCG

Primer zur Konstruktion von Expressionsvektoren mit *cib-3*

Promotor CE 1896 ATGCATGCCGACGCCTACCTCATCGCTGCTC

CE 1900 ATGGGCCCTTTCTGAAAAATGTACATTTTTTATT

Protein CE1896 ATGCATGCCGACGCCTACCTCATCGCTGCTC

CE 1897 ATGGGCCCCAGAGGAGACTTTCGAAAGTCTG

Trailer CE 1899 ATGAATTCGATGTGCTCGGCGCTATCGG

CE 1898

ATTCTAGAGGGCCCTAATGAGCGGCCGCATGTGCCCCAATTTGCTTATAAG

Primer für RNAi-Experiment

K07A1.2 dUTP-Pyrophosphatase

CE2514 TCATGACTCTTACCGTTGCTGCTCCC

CE2515 GTCGACTTAAAGGGTTATATACTGCCCCG

R53.2 Thymidylatkinase

CE 1677 GACATATGGCTACTGATCAGAAACGAGGGC

CE 1678 GACCGGGGATTTTCTCCAGCGACTCGAATGG

Y43C5A.5 *thk-1*, *thymidine kinase 1*

CE1675 GAACTAGTCATATGGACATTGAAGCGGCCAAG

CE1676 GATCTAGAAGTCCGAGCTGTGGCCTCC

Y71F9B.5 *lin-17*

CE 033 ATGATGCATTCTTTGGGCATCATTC

CE 034 GACGACCTTACTGGGTCTCCATG

K04D7.1 *rack-1*

CE 2151 ACGGGGTTACACAGATAGCAAAAT

CE 2152 GAGACCAGGCCAAAGAGATACACT

F57F5.1 Cathepsin L Cystein Proteinase

CE 2173 AATATTCGAGAAAACGCCAAACTT

CE 2174 TCCAGCGGTATGAACGTAGACTCC

C52E4.1 *cpr-1*

CE 2179 CAGTCACGCTTGCCTTTGTCC

CE 2180 ATTTTATTTGGCAGATGGTA

F44C4.3 *cpr-4*

CE 2175 CCTCATTCTTGCTGCCTTGGTG

CE 2176 AGATTATTTAGACTTTTGGGACTC

W07B8.5 *cpr-5*

CE 2177 CTGCCTCGGCTGTGGTGATTCC

CE 2178 TTCCGATAGCAGCCTTAGTTGTGA

C25B8.3 *cpr-6*

CE 2181 TCTTCCTTTCCTGCATAGTGGTAG

CE 2182 TGGTTCAGTAGTTGTCATCGTAGA

Primer für Experimente mit *cib-2*Primer zur Amplifizierung von *cib-2* (C24H12.5)

CE2685 ATGTCCGACGAGCACTATAATCCT

CE2686 ATTCTTAGTCCATTTACACAATTCT

CE2687 AAGAATCACCGCAGAGCAAGAGTA

CE2688 GCCCTGGCTTCTCAAATGCTCTC

Primer zur Sequenzierung der cDNA von *cib-2*

CE2592 CCCC GCGGAAAAGAAAAAGT

CE2593 CAGTGCCTCTCCCAGTGTCTCC

CE2594 GTGATGATGTGGCGGCAGATGAC

CE2595 CTCCAAAGCCCACATCGTCTCTGA

CE2596 GATCGTGCCGGTTTCCAGTGTCTT

weitere Primer

rack-1 Primer zur Amplifizierung der cDNA des Gens

CE 2390 GGTTTTCGTTTCGCTCTATTCTCCA

CE 2391 GCAACACCGATCAACTCATTACGA

weitere Primer zur Sequenzierung der cDNA

CE 2392 AATCGGTCGCCCAGTTCGTTC

CE 2393 GTTTCACCGTTCGTTTCTCT

CE 2394 ATCAACGCCATGTCCTTCTCT

F57F5.1(*tm 1759*) Nachweis der Deletion in dem *knock-out*-Allel

CE 2517 CTAACACACCAGAGCCAAAC

CE 2518 CCCCAATCCTCATTCCATGA

universelle Primer zur Sequenzierung klonierter Fragmente in pCR4 (aus M13)

CE 041 TCACACAGGAAACAGCTATGAC (reverse)

CE 042 CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC (forward)

6.3 Konstruierte Plasmide (Konstrukte)

Um Interaktionspartner von CIB-3 in einem Yeast-two-Hybrid zu identifizieren, und um die Lokalisierung des Proteins CIB-3 festzustellen, wurden vier verschiedene Plasmide konstruiert.

pGBKT7-*cib-3*

Für den Yeast-two-Hybrid wurde die cDNA von *cib-3* mit RT-PCR amplifiziert und in den Vektor pCR4[®]TOPO kloniert. In diesem Vektor wurde die klonierte cDNA sequenziert. Danach wurde die cDNA mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Sal*I herausgeschnitten. Das entstehende Fragment wurde aufgereinigt und gerichtet in den mit den gleichen Enzymen linearisierten Vektor pGBKT7 kloniert. Der Vektor

exprimiert das Protein CIB-3 als Fusionsprotein mit der GAL4 Binde-Domäne (BD) (siehe Abbildung 6.1).

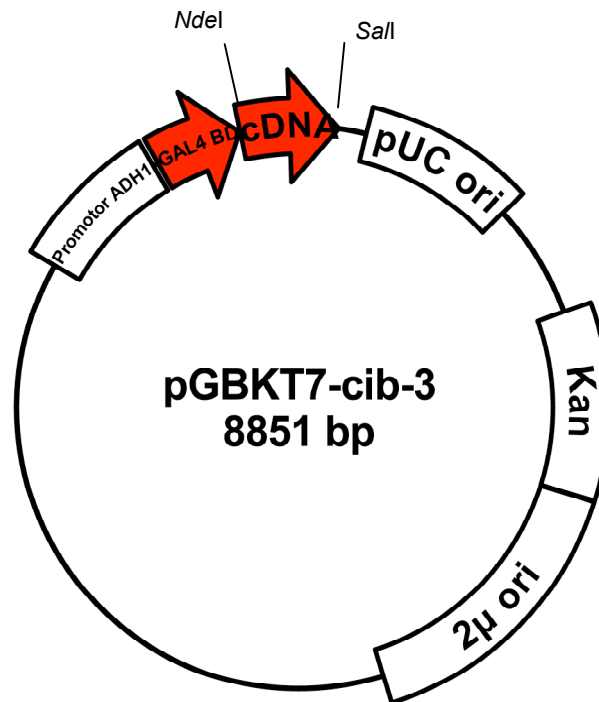


Abbildung 6.1: Vektorkarte von dem Vektor pGBKT7 mit der cDNA von *cib-3* für den Yeast-two-Hybrid.

pGADT7-*cib-3*

In den Vektor pGADT7 wurde wieder die gleiche cDNA von *cib-3* wie für den Vektor pGBKT7-*cib-3* aus dem Vektor pCR4[®]TOPO mit den Enzymen *Nde*I und *Pst*I herausgeschnitten. Das entstehende Fragment wurde aufgereinigt und gerichtet in den mit den gleichen Enzymen linearisierten Vektor pGADT7 (<http://www.clontech.com/>) kloniert. Der Vektor exprimiert das Protein CIB-3 als Fusionsprotein mit der GAL4 aktivierenden Domäne (AD) (siehe Abbildung 6.2).

Promotor::*YFP*

Um festzustellen, in welchen Zellen der Promotor von *cib-3* aktiv ist, wurde jeweils der Promotor von *cib-3* und die 3' UTR von *cib-3* mit PCR amplifiziert und in den Vektor pCR4[®]TOPO kloniert. Nach der Sequenzierung wurden beide Fragmente mit Restriktionsenzymen aus dem Vektor herausgeschnitten. Das Promotor-Fragment

wurde mit den Enzymen *SphI* und *ApaI* geschnitten, das 3' UTR-Fragment mit den Enzymen *XbaI* und *EcoRI*. Beide Fragmente wurden aufgereinigt. Der Vektor pGEM3Zf⁽⁺⁾ wurde mit den Enzymen *XbaI* und *EcoRI* linearisiert und mit dem 3' UTR-Fragment ligiert. Nach der gerichteten Klonierung wurde der neu entstandene Vektor mit den Enzymen *SphI* und *ApaI* linearisiert und das Promotor-Fragment gerichtet hinein kloniert. Zuletzt wurde der so entstandene Vektor mit dem Promotor-Fragment und dem 3' UTR-Fragment mit den Enzymen *ApaI* und *NotI* linearisiert. In diesen Vektor wurde über die beiden Schnittstellen ein YFP-Gen kloniert. Der Vektor exprimiert YFP hinter dem *cib-3*-Promotor (siehe Abbildung 6.3).

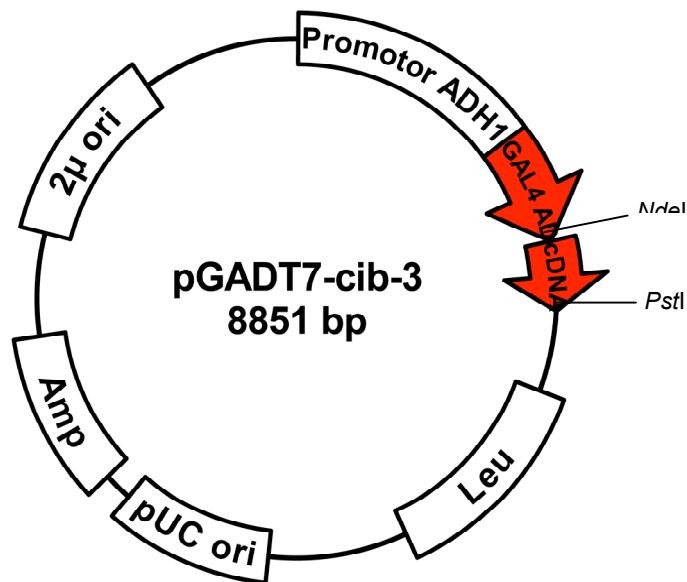


Abbildung 6.2: Vektorkarte von dem Vektor pGADT7 mit der cDNA von *cib-3* für den Yeast-two-Hybrid.

***cib-3*::GFP-Proteinfusion**

Dieser Vektor wurde für die Proteinfusion mit *cib-3* und GFP über die gleiche Strategie kloniert wie der Vektor mit Promotor von *cib-3* und YFP. An Stelle des Promotors von *cib-3* wurde ein Fragment mit dem Promotor und der codierenden Sequenz von *cib-3* über PCR amplifiziert und in den Vektor pCR4[®]TOPO kloniert. Das Fragment wurde sequenziert und in den pGEM3Zf⁽⁺⁾-Vektor mit der 3' UTR von *cib-3* kloniert. Statt YFP wurde im letzten Schritt GFP kloniert. Der Vektor exprimiert *cib-3*::GFP als Fusionsprotein hinter dem *cib-3*-Promotor (siehe Abbildung 6.4).

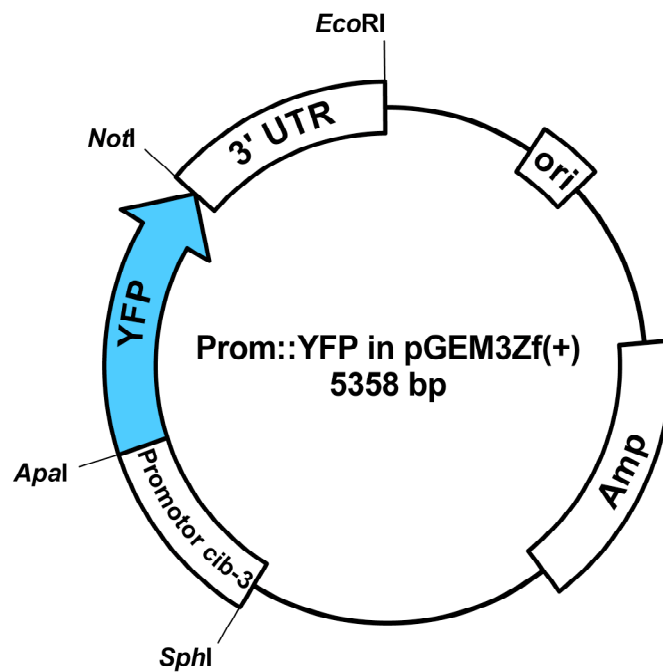


Abbildung 6.3: pGEM3Zf⁽⁺⁾ mit Promotor und 3' UTR von *cib-3* und mit YFP.

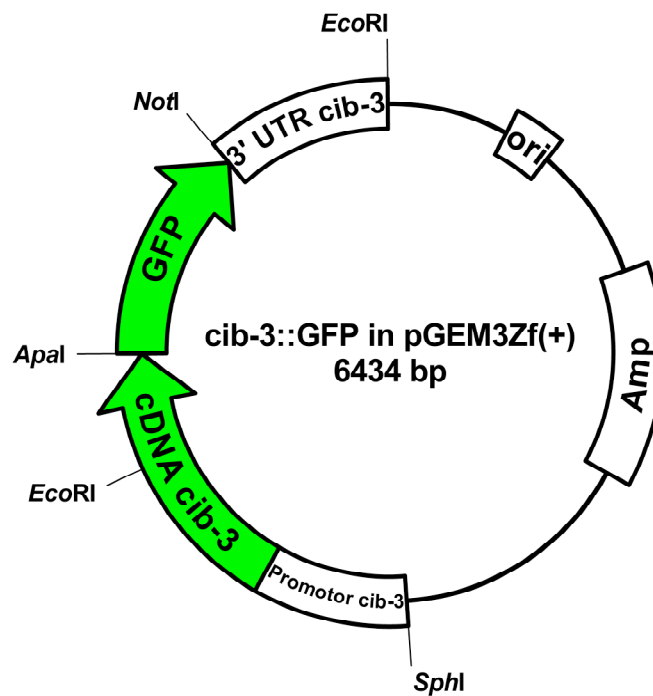


Abbildung 6.4: pGEM3Zf⁽⁺⁾ mit Promotor, cDNA und 3' UTR von *cib-3* und mit GFP.